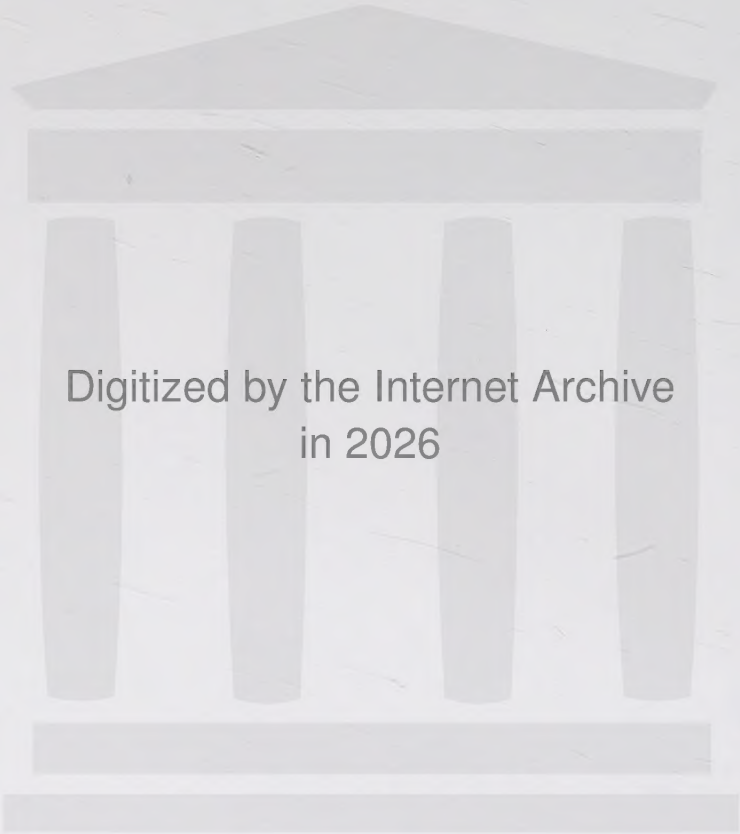
# Autoradiographische und cytochemische Untersuchungen über den intrazellulären Transport sekretorischer Proteine in der Tränendrüse (Glandula extraorbitalis) der Ratte

Herbert Vogel

1982


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546821_0005

# Autoradiographische und cytochemische Untersuchungen über den intrazellulären Transport sekretorischer Proteine in der Tränendrüse (Glandula extraorbitalis) der Ratte

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Herbert Vogel
aus Bad Wiessee

März 1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. F. Schwarzfischer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. R.A. Steinbrecht
Tag der mündlichen Prüfung: 25.Mai 1982

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität München unter Anleitung von Herrn Professor Dr. V. Herzog und mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Ich danke Herrn Professor Dr. V. Herzog für die Anregung zu der Untersuchung, für sein kritisches Interesse am Fortgang der Arbeit und für vielfältige Hilfen.

Herrn Professor Dr. Dr. F. Schwarzfischer danke ich für die Betreuung der Arbeit innerhalb der Fakultät für Biologie der Universität München.

Mein Dank gilt besonders Herrn Professor Dr. F. Miller für die großzügige Überlassung der technischen Einrichtungen seines Institutes, für seine Kritik und für seine wertvollen Ratschläge.

Den Kolleginnen und Kollegen des Institutes für Zellbiologie, Frau M. Eschrich, Frau S. Fuchs, Frau T. Lusch (Graphische Gestaltung), Frau E.-M. Prätorius (Photographie), Frau U. Reinhardt (Elektrophorese), Frau R. Schmittdiel, Frau B. Storz (Autoradiographie), Frau D. Wolfram (EM-Technik) und Herrn J. Grimm (Gerätekonstruktion), bin ich wegen ihrer Freundlichkeit und großen Hilfsbereitschaft sehr zu Dank verpflichtet. Ebenso danke ich Fräulein A. Reichert für die schnelle und exakte Ausführung der Schreibarbeiten.

Besonderer Dank gebührt Herrn Dr. H.-W. Schmidt für die vielen nützlichen Anregungen und wertvollen Diskussionen.

INHALTSVERZEICHNIS


| | | Seite |
|---|---|---|
| 1. | EINLEITUNG | 1 |
| 2. | MATERIAL UND METHODEN | 7 |
| 2.1. | Versuchsmaterial | 7 |
| 2.2. | Tränendrüsen der Ratte | 7 |
| 2.3. | Reagenzien, Photomaterialien und Radiochemikalien | 10 |
| 2.4. | Methoden | 11 |
| 2.4.1. | Gewebe- und Azinus-Präparation | 11 |
| 2.4.2. | Biochemische Untersuchungsmethoden | 15 |
| 2.4.2.1. | Einbau von L-(4,5-$^{3}$H)-Leucin in Azini | 15 |
| 2.4.2.2. | In vitro-Sekretgewinnung | 15 |
| 2.4.2.3. | Messung der Radioaktivität | 16 |
| 2.4.2.4. | Colorimetrischer Nachweis der Peroxidase-Aktivität | 16 |
| 2.4.2.5. | Elektrophorese | 18 |
| 2.4.3. | Cytochemischer Peroxidase-Nachweis mit DAB | 20 |
| 2.4.4. | Messung der Sauerstoffaufnahme durch isolierte Azini | 23 |
| 2.4.5. | Mikroskopie | 24 |
| 2.4.5.1. | Gewebepräparation nach Perfusions-Fixierung | 24 |
| 2.4.5.2. | Lichtmikroskopie | 26 |
| 2.4.5.3. | Elektronenmikroskopie | 26 |
| 2.4.6. | Autoradiographie | 26 |
| 2.4.6.1. | Lichtmikroskopische Autoradiographie | 27 |
| 2.4.6.2. | Elektronenmikroskopische Autoradiographie | 27 |
| 2.4.6.3. | Quantitative Auswertung der Autoradiogramme | 30 |
| 2.4.7. | DNS-Bestimmung | 30 |
| 2.4.8. | Statistik | 30 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| 3. | ERGEBNISSE | 31 |
| 3.1. | Struktur isolierter Azini | 31 |
| 3.2. | Biochemische und Physiologische Ergebnisse | 34 |
| 3.2.1. | Einbau von L-(4,5-$^{3}$H)-Leucin in Azini | 34 |
| 3.2.2. | Peroxidase-Sekretion isolierter Azini | 36 |
| 3.2.3. | IEF-Gelelektrophoretische Untersuchungen des Tränendrüsensekretes | 37 |
| 3.2.4. | Sauerstoffverbrauch isolierter Azini | 39 |
| 3.3. | Cytochemische Ergebnisse | 44 |
| 3.3.1. | Peroxidaselokalisation im Tränendrüsen-Gewebe | 44 |
| 3.3.2. | Peroxidaselokalisation in Zellen isolierter Tränendrüsen-Azini | 47 |
| 3.4. | Autoradiographie | 50 |
| 3.4.1. | Lichtmikroskopische Autoradiographie | 50 |
| 3.4.2. | Elektronenmikroskopische Autoradiographie | 52 |
| 3.4.3. | Bestimmung der Silberkorndichte | 52 |
| 3.4.4. | Vergleich verschiedener Entwicklungsmethoden in der Autoradiographie | 62 |
| 4. | DISKUSSION | 66 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG | 80 |
| 6. | LITERATURVERZEICHNIS | 82 |

## 1. EINLEITUNG

Für Untersuchungen über den intrazellulären Transport sekretorischer Proteine eignen sich die Zellen exokriner Drüsen wie Pankreas, Parotis und Lacrimalis besonders gut. Sie speichern ihre Sekretprodukte in lichtmikroskopisch sichtbaren Sekretgranula, stellen genügend Gewebe für in vitro-Untersuchungen zur Verfügung und bestehen überwiegend aus einem einzigen sekretorischen Zelltyp, der Drüsenendstück-(Azinus)-Zelle (bei der Lacrimalis zu 80% (Herzog et al., 1976; Putney et al., 1978)). Durch Zellfraktionierung und elektronenmikroskopische Untersuchungen am exokrinen Pankreas des Meerschweinchens und der Taube war erstmals eine Beschreibung des sekretorischen Prozesses möglich. Siekevitz und Palade (1956-1960) beschrieben membrangebundene Ribosomen als den Syntheseort sekretorischer Proteine und zeigten, daß neusynthetisierte sekretorische Proteine durch die Membran in die Zisternen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (RER) segregiert, zu den Sekretgranula transportiert und in das Drüsenlumen durch Exocytose entleert werden.

Die Methode der Zellfraktionierung wurde später durch die elektronenmikroskopische Autoradiographie ergänzt (Caro und Palade, 1964). Mit der in vivo-Pulsmarkierung war die Pulswelle unscharf und die zeitliche Auflösung des Proteintransportes nicht zufriedenstellend. Erst mit dem Wechsel zu in vitro-Systemen (Redman et al., 1966; Jamieson und Palade, 1967 a, b; Castle et al., 1972; Scheele und Palade, 1975) war eine genauere Bestimmung des zeitlichen Ablaufs des sekretorischen Prozesses in der Pankreaszelle möglich. Die Studien von Jamieson und Palade mit Gewebeschnitten des Meerschweinchen-Pankreas (1967 a, b) und von Castle et al. mit Drüsenläppchen der Kaninchen-Parotis (1972) machten die großen Vorteile der in vitro-Untersuchungen für sekretorische Systeme deut-

lich:

(a) Die Zusammensetzung des extrazellulären Milieus konnte kontrolliert und variabel gestaltet werden,

(b) aus den Drüsen sezernierte sekretorische Proteine können aus dem umgebenden Medium gesammelt und analysiert werden und

(c) das Gewebe weniger Tiere reicht für mehrere gleichzeitig stattfindende Experimente aus.

Aufgrund der Untersuchungen am exokrinen Pankreas kann der sekretorische Prozeß in folgende Schritte unterteilt werden (Palade, 1975):

1. Synthese der sekretorischen Proteine an membrangebundenen Ribosomen des RER,
2. Segregation der exportablen Proteine in die Zisternen des RER,
3. Intrazellulärer Transport vom RER zum Golgi-Komplex,
4. Konzentration und Modifikation der sekretorischen Proteine im Golgi-Komplex,
5. Intrazelluläre Speicherung in Sekretgranula und
6. Ausschüttung der sekretorischen Proteine ins Drüsenlumen.

Dieser sekretorische Prozeß findet mit geringen Abweichungen in allen exokrinen Drüsen wie z.B. der Kaninchen-Parotis (Castle et al., 1972), Ratten-Lacrimalis (Herzog und Miller, 1972; Herzog et al., 1976) und Ratten-Submandibularis (Bogart, 1977) statt. Charakteristische Unterschiede ergeben sich beim Transportweg (z.B. im Golgi-Bereich) und der Transportdauer sekretorischer Proteine (Jamieson und Palade, 1967 a, b; Castle et al., 1972; Bogart, 1977).

Inzwischen wurde das in vitro-System für die Untersuchungen an sekretorischen Drüsen verbessert. Während Jamieson und Palade (1967 a, b) noch Gewebeschnitte vom exokrinen Meerschweinchen-Pankreas verwendeten, isolierten Castle

et al. (1972), und Scheele und Palade (1975) Drüsenläppchen (Lobuli) von der Kaninchen-Parotis oder vom Meerschweinchen-Pankreas und Herzog und Farquhar (1977) Drüsen-Azini der Ratten-Parotis und -Lacrimalis. Azini sind die kleinsten funktionellen Drüseneinheiten, bei denen die Zellen im Gegensatz zu isolierten Einzelzellen ihre strukturelle und funktionelle Polarität beibehalten. Im Vergleich zu Gewebefragmenten oder Lobuli ist außerdem bei isolierten Azini wegen ihres geringen Durchmessers (40-60 µm) die Substrataufnahme (z.B. radiomarkierter Aminosäuren) erleichtert.

Während für das exokrine Pankreas und für die Parotis der zeitliche Ablauf der Synthese und des Transports sekretorischer Proteine bekannt sind (Jamieson und Palade, 1967 b; Castle et al., 1972), fehlen detaillierte Studien für die Tränendrüse. Bisherige Untersuchungen beschränkten sich auf die Lokalisation und Sekretion der Peroxidase (Herzog und Miller, 1972; Herzog et al., 1976; Herzog, 1979; Putney et al., 1978; Friedman et al., 1981) und auf Regulationsmechanismen bei der Sekretion exportabler Proteine und beim Ionentransport durch die Zellmembran (Keryer und Rossignol, 1976; Parod et al., 1978-1980; Herman et al., 1978; Iwatsuki und Petersen, 1978; Putney et al., 1978; Botelho und Dartt, 1979; Friedman et al., 1981; Jahn und Söling, 1981). Der zeitliche Ablauf der Synthese und des Transports durch die Zelle sowie der genaue Transportweg der sekretorischen Proteine durch den Golgi-Bereich sind noch ungeklärt.

Lacrimalis-Zellen wie auch Parotis-Zellen (Castle et al., 1972) sind für in vitro-Experimente besonders geeignet, weil sie über keine meßbaren proteolytischen und lipolytischen Aktivitäten verfügen, die bei längerer Versuchsdauer Membranveränderungen durch Abbau von Membran-

bestandteilen bewirken können (Meldolesi et al., 1971). Zur Untersuchung des sekretorischen Prozesses war es notwendig, geeignete Untersuchungsmethoden zur zeitlichen und räumlichen Auflösung des Sekrettransportes in der Azinuszelle der Tränendrüse zu finden. Dafür bot sich eine kombinierte Methode aus dem in vitro-System mit isolierten Azini, der elektronenmikroskopischen Autoradiographie und dem cytochemischen Nachweis eines sekretorischen Proteins, z.B. der Peroxidase (Herzog und Miller, 1972; Herzog et al., 1976) an. Die Kombination wurde deshalb gewählt, weil zur Lösung der Fragestellung die Autoradiographie oder der cytochemische Nachweis der Peroxidase allein nicht ausreichen. Die Autoradiographie gestattet kinetische Untersuchungen über den intrazellulären Transport sekretorischer Proteine, aber ihre räumliche Auflösung ist beschränkt. Diese wird erreicht durch Kombination der Autoradiographie mit der cytochemischen Darstellung der sekretorischen Peroxidase mit 3,3-Diaminobenzidin (DAB) (Graham und Karnovsky, 1966; Seligman et al., 1968; Essner, 1971; Herzog und Miller, 1972; Herzog et al., 1976). Die Darstellung mit DAB hat den Vorteil, daß derselbe Wasserstoff-Donor sowohl biochemisch (Herzog und Fahimi, 1973; Fahimi und Herzog, 1973) als auch cytochemisch zum Nachweis der Peroxidase-Aktivität verwendet werden kann. Tabelle I verdeutlicht die Nachteile der autoradiographischen oder der cytochemischen Methoden und die Vorteile, die sich aus der Kombination beider Techniken ergeben können.

Tabelle I

| | Elektronenmikroskopische Autoradiographie | Cytochemischer Peroxidase-Nachweis |
|---|---|---|
| Vorteile: | Darstellung von Richtung und Kinetik des intrazellulären Transportes sekretorischer Proteine | Darstellung der am sekretorischen Prozeß beteiligten Kompartimente in hoher räumlicher Auflösung |
| Nachteile: | Begrenzte räumliche Auflösung (HD-Wert)[+)] | Richtung und Kinetik des intrazellulären Transportes nicht darstellbar |

[+)] siehe 3.4.4.

Die Peroxidase der Tränendrüse ist bei der Ratte etwa 13 Tage nach der Geburt, wenn sich die Augenlider öffnen, in allen sekretorischen Kompartimenten der Azinus-Zelle nachweisbar (Herzog und Miller, 1972). Sie ist in ihrer Struktur der Lactoperoxidase sehr ähnlich (Morrison und Steele, 1968), die gemeinsam mit Halogenen und $H_2O_2$ eine bakterizide, fungizide und viruzide Funktion ausüben kann (Klebanoff und Lübke, 1965; Belding et al., 1970). Ihr sekretorischer Charakter wurde cytochemisch durch ihre intrazelluläre Lokalisation und ihre Freisetzung in das Azinuslumen nach cholinerger Stimulation und biochemisch

nachgewiesen (Herzog und Miller, 1972; Herzog et al., 1976).

Die sekretorischen Proteine der Tränendrüse werden in den Sekretgranula zwischen dem Golgi-Komplex und dem Azinuslumen gespeichert. Ihre Neubildung und Ausschüttung unterliegt hormonellen Regelmechanismen, dem 'stimulus-secretion coupling' (Douglas, 1968). Die Stimulation der Tränendrüse erfolgt in erster Linie über cholinerge (= muskarine) Rezeptoren (Herzog et al., 1976; Keryer und Rossignol, 1976; Putney et al., 1978 ). Erst in den letzten Jahren wurden zusätzliche $\alpha$- und ß-adrenerge Zellrezeptoren postuliert (Herman et al., 1978; Putney et al., 1978; Friedman et al., 1981).

In der vorliegenden Arbeit wurde der intrazelluläre Transport und die Sekretion exportabler Proteine am System isolierter Azini untersucht. Dabei interessierten folgende Fragen:

(1) Welche Kompartimente sind am intrazellulären Transport beteiligt?
(2) In welcher zeitlichen Folge werden die sekretorischen Kompartimente während des intrazellulären Transports durchlaufen?

Da der intrazelluläre Transport zwischen RER und den Sekretgranula diskontinuierlich verläuft und dadurch kompliziert erscheint, galt das besondere Interesse dieser Untersuchungen der detaillierten Darstellung des sekretorischen Weges im Bereich des Golgi-Komplexes.

# 2. MATERIAL UND METHODEN

## 2.1. Versuchsmaterial

Für die Versuche wurden junge männliche Wistar-Albino-Ratten mit einem Gewicht von 70-80 g der Firma Thomae, Biberach, verwendet. 16-20 Stunden vor den Versuchen wurde ihnen Wasser und Futter entzogen.

## 2.2. Tränendrüsen der Ratte

Die Ratte besitzt zwei Tränendrüsen. Die größere von beiden ist die Glandula extraorbitalis oder auch Loewenthal'sche Drüse (Loewenthal 1899, 1900). Sie liegt unmittelbar rostral von der Ohrspeicheldrüse (Glandula parotis) und ventronasal vom äußeren Ohr (Abb. 1). Sie ist flach und linsenförmig. Bei erwachsenen männlichen Albinoratten beträgt ihr Durchmesser 8,5 bis 12,0 mm und ihre Dicke 2-3 mm. Die Außenfläche der Drüse ist konvex, die Innenfläche leicht konkav geformt. Ihr Feuchtgewicht beträgt etwa 50 mg. Von der Speicheldrüse kann sie durch ihre dunklere Farbe und die fehlende Läppchengliederung unterschieden werden.

Die kleinere der beiden Tränendrüsen, die Glandula infraorbitalis (Loewenthal, 1895), liegt innerhalb der Orbita (Abb. 1). Sie ist wahrscheinlich sekundär durch Knospung aus dem Ausführgang der Glandula extraorbitalis hervorgegangen (Loewenthal, 1912). Zwischen beiden Drüsen gibt es keine morphologischen und physiologischen Unterschiede. Deshalb wurden alle Untersuchungen an der leichter zugänglichen Glandula extraorbitalis vorgenommen.

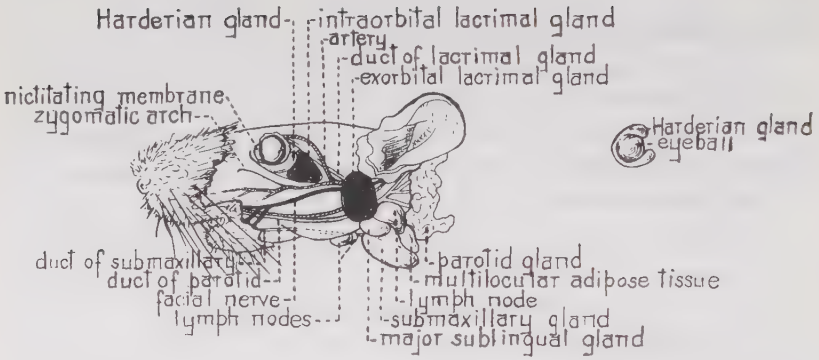



Abb. 1: Topographische Lage der Tränendrüsen der Ratte. Gelb: Glandula orbitalis interna (gl. infraorbitalis). Violett: Glandula orbitalis externa (gl. extraorbitalis). (Aus: "Anatomy of the Rat", E.Ch. Greene, 1963).

Da bei den Tränendrüsen männlicher und weiblicher Ratten ein Geschlechtsdimorphismus besteht (Gabe, 1955; Baquiche, 1959; Venkovsky, 1961; Martinazzi, 1963; Luciano, 1967; Übersicht: Tilgner, 1967), wurden nur Drüsen männlicher Ratten verwendet.
Weil sich die Tränendrüsen während des Alterns morphologisch stark verändern (Harderisation; Walker, 1958; Tilgner, 1967), wurden 6 Wochen alte, gerade erwachsene, Ratten für die Versuche verwendet.

Die Tränendrüse (Lacrimalis) der erwachsenen Ratte ist eine zusammengesetzte tubulo-azinäre Drüse. Sie besteht hauptsächlich aus dichtgepackten sekretorischen Drüsen-

endstücken oder Azini (Abb. 2), die sich aus einer einschichtigen Lage von 6-8 pyramidenförmigen Zellen zusammensetzen und ein enges Lumen umschließen. Der Azinusdurchmesser beträgt bei männlichen Ratten etwa 40-60 µm. Die Azini werden von einer Basalmembran umhüllt. Zwischen der Basalmembran und den Drüsenzellen liegen Myoepithelzellen, die wahrscheinlich tonusgebend sind (Leeson, 1960, 1972) und wie die Myoepithelzellen der Speicheldrüsen (Garrett und Emmelin, 1979) möglicherweise cholinerge Rezeptoren besitzen.

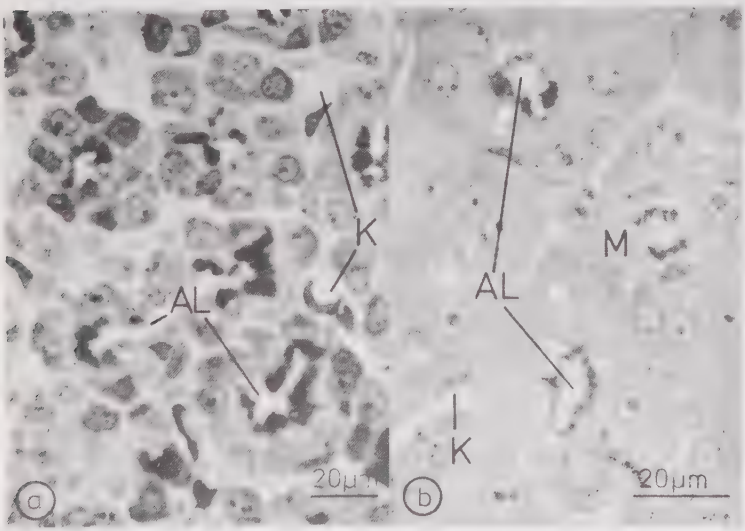



Abb. 2: Ausschnitt aus der Tränendrüse einer 6 Wochen alten Ratte.
(a) Azini im Ruhezustand nach Perfusionsfixation mit Karnovsky's Fixativ und anschließender Fixierung mit Osmium und reduziertem Osmium.
Schnittdicke: 1 µm. Vergrößerung: 620 x.
(b) Azini nach Stimulation mit Carbachol, Perfusionsfixierung mit Karnovsky's Fixativ und anschließender Fixierung mit Tannin. Die Azinus-Lumina (AL) sind durch Carbachol-induzierte Exocytose erweitert, K, Kapillare; M, Mitose einer Drüsenendstückzelle, späte Anaphase.
Schnittdicke: 1 µm. Vergrößerung: 910 x.

## 2.3. Reagenzien, Photomaterialien und Radiochemikalien

### Reagenzien

Gibco-Medium[+)] 109, 189: Biocult-Chemie, Karlsruhe.
Glutaraldehyd 70%: Ladd Research Industries Inc., Burlington, Vermont, USA.
Insta Fluor, Quickzint: Packard Instruments, Frankfurt/Main.
Epon 812: Polaron Equipment Ltd., London, England.
Mg-Uranylacetat, Parlodion, p-Phenylendiamin (PPD), Pyrocatechol (PC): Polysciences, über: Paesel GmbH, Frankfurt/Main.
Acrylamid, Bisacrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid, Isoproterenol, Propylenoxid: Serva Biochemie, Heidelberg.
Carbamylchlorid (Carbachol), 3,3-Diaminobenzidin-Tetrachlorid (DAB), Dinitrophenol (DNP), DNS (Kalbsthymus), Kolchizin, Laurylsulfat (SDS), L-Leucin, Riboflavin, Rinderserumalbumin (RSA), Tanninsäure, Triton-X-100: Sigma Chemie, München.
2,5-Diphenyloxazol, Soluen: W. Zinsser, Frankfurt/Main.
Collagenase CLS IV (168 u/mg), Soybean-Trypsin-Inhibitor (1 mg hemmt 1,75 mg Trypsin), Trypsinogen: Worthington Biochem. Corp., Freehold, N.J., USA.

### Photomaterial

4-(methylamino)-phenol Sulfat (Elon): Ega Chemie, Steinheim.
Ilford L4-Emulsion, PQ-Universal-Entwickler, Ilfofix: Ilford Ltd., Essex, England.
D 19b-Entwickler: Kodak, Stuttgart.

---

[+)] entspricht Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle's Salzen (Eagle, 1959).

Radiochemikalien

L-(4,5-$^3$H)-Leucin (spezif. Aktivität 59 Ci/mMol),
($^3$H)-Aminosäure-Mischung (spezif. Aktivitäten: TRK. 440),
($^3$H)-Toluol-Standard-Lösung (0,2415 µCi/ml: Amersham-Buchler, Braunschweig.

## 2.4. Methoden

### 2.4.1. Gewebe- und Azinus-Präparation

Die Isolierung der Tränendrüsen-Azini erfolgte nach einer Modifikation der von Herzog und Farquhar (1977) beschriebenen Methode.

Isolationsmedien:

(a) Gibco 109: 100 ml Eagle's Medium (MEM) mit Earle's Salzen, pH 7.35
10 mg Trypsin-Inhibitor (1 mg hemmt 1,75 mg Trypsin)
29 mg L-Glutaminsäure
100 mg D-Glucose

(b) Gibco 189: - leucinfreies Medium - Konzentrationen von Trypsin-Inhibitor, L-Glutaminsäure und D-Glucose wie bei Gibco 109. (Dieses Medium wurde bei Isolierungen mit anschließender L-(4,5-$^3$H)-Leucin-Pulsmarkierung benützt.)

Vor Gebrauch wurden die Medien durch TCM-100-Bakterien-Membranfilter filtriert (Gilman Instruments, Ann Arbor, Michigan, USA; Porengröße 0,2 µm; Nr.: 80 959).

Glaswaren:

Alle zur Gewebe- und Azinus-Präparation verwendeten Glaswaren wurden ohne Detergentien gespült. Die für die Azinus-Isolierung benötigten Pasteurpipetten mit einem inneren Spitzendurchmesser von 800, 600, 400 und 200 µm wurden durch Anschmelzen der Spitzen hergestellt und mit einer Meßlupe sortiert. Alle Glaswaren wurden silikonisiert, um ein Haftenbleiben der Gewebeteilchen oder Azini am Glas zu verhindern.

Gewebepräparation:

Die Tränendrüsen wurden unter Äthernarkose durch einen Hautschnitt vom Mundwinkel bis zum unteren Ohransatz freigelegt und schnell herauspräpariert, in Isolationsmedium von der Bindegewebskapsel befreit, mit einer Rasierklinge in etwa 1 $mm^3$ große Stücke geschnitten und bei 4°C gewaschen (Tab. II, Schritte (1)-(3)). Anschließend wurden die Gewebeteilchen für die in vitro-Sekretgewinnung (2.4.2.2.) oder zur Azinus-Isolierung weiterverwendet.

Azinus-Isolierung:

Frisch präparierte Gewebeteilchen wurden in Verdauungs-Medium (1 mg/ml Collagenase in MEM) in einem Schüttelwasserbad (~70 Agitationen/min) bei 37°C und Begasung mit 72% $N_2$, 20% $O_2$ und 8% $CO_2$ inkubiert. Der pH-Wert des Verdauungsmediums (pH 7,3-7,4) wurde durch kontinuierliche Messung kontrolliert (Tab. II, Schritt (4)). Nach einer Verdauungszeit von 25-40 min wurden die Gewebeteilchen durch Pipettieren mit Pasteurpipetten abnehmenden inneren Spitzendurchmessers (800-200 µm) dissoziiert (Schritt (4)). Anschließend wurde die Suspension aus Azini, Fibroblasten und Zelltrümmern durch eine Nylon-Gaze (Schweizerische Seidenfabrik, Zürich) mit einer Maschenweite

von 200 µm) filtriert (Schritt (5)), 30 sec bei 70xg in der Labofuge II (Heraeus Christ, Osterode) zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das lockere Pellet in Collagenase-freiem Medium resuspendiert (Schritt (6)). Dieser Waschvorgang wurde 3x wiederholt. Danach wurden je 2 ml Azinus-Suspension mit 5 ml RSA (4% in Isolationsmedium) unterschichtet, 5 min bei 70xg in der Labofuge zentrifugiert (Schritt (7)) und die sedimentierten Azini in frischem Medium resuspendiert (Schritt (8)).

Überprüfung der morphologischen und funktionellen Integrität der Azini:

Vor der Weiterverwendung wurde die Qualität der Azinus-Präparation lichtmikroskopisch (Ultraphot III, Zeiss, Oberkochen) untersucht. Als Maß für den Funktionszustand der Azini wurde ihr Sauerstoff-Verbrauch im Ruhezustand und bei Carbachol-Stimulation gemessen (s. 2.5.4.).

Tabelle II: Präparation von Tränendrüsen-Azini

| Schritte | Behandlung | Medium | Zeit | Temperatur |
|---|---|---|---|---|
| (1) | Herauspräparieren der Tränendrüsen | Eagle's Medium (MEM) | 2 min | Raumtemperatur |
| (2) | Zerschneiden der Drüsen in kleine Stücke und Entfernen des Bindegewebes | + Earle's Salze<br>+ Trypsin-Inhibitor<br>+ L-Glutaminsäure<br>+ D-Glukose | 3 min | 4°C |
| (3) | Waschen der Gewebeteilchen | | 3x2 min | |
| (4) | Enzymatische Verdauung und Pipettieren mit Pasteur-Pipetten (innerer Spitzendurchmesser 800, 600, 400 und 200/um) | MEM<br>+ Collagenase<br>+ Begasen mit 72%$N_2$, 20% $O_2$ und 8% $CO_2$ (pH 7,34) | 45 min | 37°C |
| (5) | Filtrieren durch Nylon-Gaze<br>Maschenweite 200/um | wie Schritt (1)-(3) | 2 min | Raumtemperatur |
| (6) | Waschen der Azini | wie Schritt (1)-(3) | 3x2 min | |
| (7) | Unterschichten der Azinus-Suspension mit 4% RSA und Zentrifugation (30 sec bei 70xg) | wie Schritt (1)-(3) | 5x5 min | |
| (8) | Dekantieren des Überstandes und Resuspendieren der sedimentierten Azini in MEM | wie Schritt (1)-(3) | variabel | |

## 2.4.2. Biochemische Untersuchungsmethoden

### 2.4.2.1. Einbau von L-(4,5-$^3$H)-Leucin in Azini

Nach der Isolierung der Azini in leucinfreiem Medium (Gibco 189) wurden die Präparationen halbiert, 30 sec bei 70xg in der Labofuge II (Heraeus Christ) zentrifugiert und in ($^3$H)-Leucin (spezifische Aktivität 59 Ci/mMol; 50 uCi/ml) in Gibco 189 resuspendiert. Darauf wurden die Proben im Schüttelwasserbad (37°C, 60 Agitationen/min) inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen. Diese wurden 2x bei 4°C 30 sec in der Minifuge II (Heraeus Christ) bei 70xg zentrifugiert, in Gibco 189 resuspendiert und 3 min bei 15 000xg in der Centrifuge (Typ 5412, Eppendorf, München) zentrifugiert. Von jeder Probe wurden im Überstand und in pelletierten Azini die Radioaktivitäten gemessen. Außerdem wurde in jedem Pellet die DNS bestimmt.

### 2.4.2.2. In vitro-Sekretgewinnung

Gewebeteilchen der Tränendrüse wurden entweder in ($^3$H)-Leucin (spezifische Aktivität 59 Ci/mMol; 500 uCi/ml) oder in einem ($^3$H)-Aminosäuregemisch (500 uCi/ml) 30 min bei 37°C inkubiert. Darauf wurden die Gewebeteilchen gewaschen, in Chase-Medium (Gibco 109 + ($^1$H)-Leucin, 4 mM Endkonzentration) übertragen und bei 37°C 2 h mit 60 Agitationen/min geschüttelt. Anschließend wurden sie bei 70xg zentrifugiert, in Gibco 109 resuspendiert und mit $10^{-5}$ M Carbachol stimuliert. Nach 1 h wurden die Überstände und Pellets durch Zentrifugation (3 min bei 5000xg und 4°C) voneinander getrennt und die Überstände für die Elektrophorese vorbereitet.

2.4.2.3. Messung der Radioaktivität

Sämtliche Messungen ($^3H$)-markierter Testsubstanzen wurden mit dem Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer 'Packard Tri-Carb' (Fa. Packard, Frankfurt/Main) durchgeführt. Als Szintillatoren wurden Insta-Fluor und Quickzint (10 ml/Probe) verwendet. Kleine feste Proben (z.B. Azini-Pellets) wurden in 1 ml Soluen 2 h bei 50°C aufgeschlossen und je nach Aktivität verdünnt. Größere Gewebestückchen wurden mit Elutionspuffer:

10 mM Tris
20 mM KCl
} in 250 ml $H_2O$ bidest. pH 7,4

in einem Potter-Elveijehm-Glashomogenisator mit einem Teflon-Pistill homogenisiert und anschließend wie die Pellets weiterbehandelt. Sämtliche cpm-Werte wurden mit ($^3H$)-Toluol (0.2415 µCi/ml) als internen Standard korrigiert und die Radioaktivität in dpm ausgedrückt.

2.4.2.4. Colorimetrischer Nachweis der Peroxidase-Aktivität

Nach der Azinus-Isolierung wurde die Präparation in mehrere Fraktionen geteilt und mit $10^{-4}$ M Atropin oder $10^{-5}$M Carbachol im Schüttelwasserbad (37°C, 60 Agitationen/min) inkubiert. Die Ruhesekretion wurde ohne Zusatz von Sekretagoga oder Inhibitoren bestimmt. Zu bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen, bei 15000xg 3 min in der Centrifuge (Eppendorf) zentrifugiert und die Überstände und Pellets zur Peroxidase oder DNS-Bestimmung verwendet.

Messung der Peroxidase-Aktivität mit 3,3-Diaminobenzidin-Tetrachlorid (DAB)

DAB wird von der Tränendrüsenperoxidase in Anwesenheit von $H_2O_2$ oxidiert. Dabei entsteht ein Farbstoff, der sich colorimetrisch bestimmen läßt (Herzog und Fahimi, 1973; Fahimi und Herzog, 1973).

Reagenzien: DAB-Lösung

(a) 100 mg Gelatinepulver
50 ml 0,2 M Tris
} Lösen unter Erwärmen auf 70°C; Abkühlen.

(b) 300 mg DAB in
45 ml $H_2O$ bidest. (Ultraschall)

(a) + (b) zusammengeben, pH auf 6,8 einstellen und mit $H_2O$ auf 100 ml auffüllen.

$H_2O_2$

50 µl $H_2O_2$ (30%)
25 ml 0,2 M Tris
20 ml $H_2O$ bidest.
} auf pH 6,8 einstellen

Reaktionsansatz:

0,85 ml DAB-Lösung
0,05 ml Probe
Start mit 0,10 ml $H_2O_2$ (0,03%)

Gemessen wurde die Extinktion $E_{465/1\ cm}$ im Gilford Spectrophotometer 2400 (Gilford Instruments, Düsseldorf) während 5 min.

Berechnung der Peroxidase-Aktivität:

Die DAB-Lösung hat ein Absorptionsmaximum bei 465 nm (Herzog und Fahimi, 1973). Das Ansteigen der Absorption ist proportional der Peroxidase-Aktivität. 1 Peroxidase (POD)-Einheit katalysiert den Abbau von 1/uMol $H_2O_2$/min bei 25°C. Mit Meerrettich-Peroxidase als Standard ergibt sich:

$$E_{465/1\ cm} = 0{,}316 = 100/\text{uMol } H_2O_2 = 100 \text{ POD-Einheiten}$$

2.4.2.5. Elektrophorese

Das in vitro gewonnene Sekret wurde in einem Mikro-Ultrafiltrations-System (Modell 8 MC, Amicon, Witten) mit Diaflo PM 10 Ultrafiltration-Membranen konzentriert und gegen Elutionspuffer (s. 2.4.2.3.) dialysiert. Dadurch wurden nicht nur die störenden Salze des Inkubations-Mediums, sondern auch bei radiomarkierten Proben freies ($^3$H)-Leucin oder freie ($^3$H)-Aminosäuren entfernt.

Die gelelektrophoretischen Untersuchungen beschränken sich auf die isoelektrische Fokussierung, wobei die enzymatische Aktivität erhalten bleibt. Diese geht bei der SDS-Gelelektrophorese durch Abspalten der Hämgruppe vom Protein verloren.

IEF-(Iso-Elektro-Fokussier)-Flachgel-Elektrophorese:

Für die IEF-Gel-Elektrophorese wurde ein Flachgel von 1 mm Dicke aus 5% Polyacrylamid* hergestellt und unter Zugabe von Riboflavin und Ammoniumpersulfat 1 h unter Neonlicht polymerisiert (Scheele, 1975). Nach Auftragen von 20-50/ul Proben wurden die Proteine mit dem LKB-Multiphor-System ( LKB Produkter, Stockholm, Schweden)

---

* mit Ampholyt pH 3,0 - 10,0

1,5 h mit 20 Watt und unter konstanter Kühlung des Gels mit einem K 2 R Lauda-Kälte-Kleinthermostat (Dr. R. Wobster KG, Lauda) getrennt. Danach wurde der pH-Gradient im Gel in 0,5 cm-Intervallen durch Aufsetzen einer Oberflächen-pH-Glas-Elektrode Typ 403 M 8 (Dr. W. Ingold KG, Frankfurt/Main) gemessen.
Nach einem Zwischenbad in

| | | | |
|---|---|---|---|
| 10% | SDS | 10 ml | } mit $H_2O$ auf 100 ml auffüllen |
| 0,5 M | Tris, pH 6,8 | 6 ml | |

wurden die Gele in das IEF-Färbebad (Scheele, 1975)

| | | | |
|---|---|---|---|
| 0,75% | Coomassie-Blau R | 20 ml | } Färbezeit: 15 min bei 60°C |
| | $H_2O$ bidest. | 83 ml | |
| 22,5% | Sulfosalizylsäure | 20 ml | |
| 100% | Trichloressigsäure | 15 ml | |

und anschließend ins Entfärbebad überführt.

| | | |
|---|---|---|
| $H_2O$ bidest. | 1950 ml | } variabel |
| Methanol 100% | 750 ml | |
| Essigsäure | 250 ml | |

Sobald die Gele entfärbt und die Banden klar erkennbar waren, wurden sie gewässert, photographiert und getrocknet.

Peroxidase-Nachweis in IEF-Gelen mit DAB

Anstelle der Coomassie-Blau-Färbung wurden die Gele mit 0,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) 30 min bei 4°C fixiert, 30 min in $H_2O$ gewaschen und in DAB-Färbebad bei 25°C 1 h im Dunkeln inkubiert, wobei gleichzeitig mit den Gelen 5 µl $H_2O_2$ (30%) pro 50 ml Reagenz hinzugefügt wurde. Anschließend wurden sie 30 min in 5%iges Glycerin gelegt, photographiert und getrocknet. Banden mit Peroxidaseaktivität sind dunkelbraun gefärbt.

Peroxidase-Nachweis in IEF-Gelen mit PPD/PC
(p-Phenylendiamin-dihydrochlorid/Pyrocatechol)

Eine andere sensitive Methode zum Nachweis von Peroxidase stellt das von Hanker und Yates (1977) beschriebene PPD/PC-Reagenz dar. Es soll im Gegensatz zum möglicherweise kanzerogenen DAB völlig ungefährlich sein.

Farbreagenz:

| | | |
|---|---|---|
| PPD | 7,5 mg | } in 10 ml 0,1 M Tris |
| PC | 15,0 mg | } pH 7,6 + 0,1 ml $H_2O_2$ (1%) |

Die Gele wurden darin 1 h inkubiert, dann 30 min in 5%iges Glycerin gelegt, photographiert und getrocknet. Banden mit Peroxidaseaktivität sind weinrot-braun gefärbt.

## 2.4.3. Cytochemischer Peroxidase-Nachweis mit DAB

Die cytochemische Darstellung der Tränendrüsen-Peroxidase erfolgte nach einer Modifikation der DAB-Methode (Graham und Karnovsky, 1966; Seligman et al., 1968; Herzog und Fahimi, 1973, 1976). Das Enzym oxidiert in Anwesenheit von $H_2O_2$ DAB zu einem braunen Reaktionsprodukt, aus dem durch Behandlung mit Osmiumtetroxid ($OsO_4$) das licht- und elektronenmikroskopisch sichtbare Osmiumschwarz entsteht (Abb. 3).

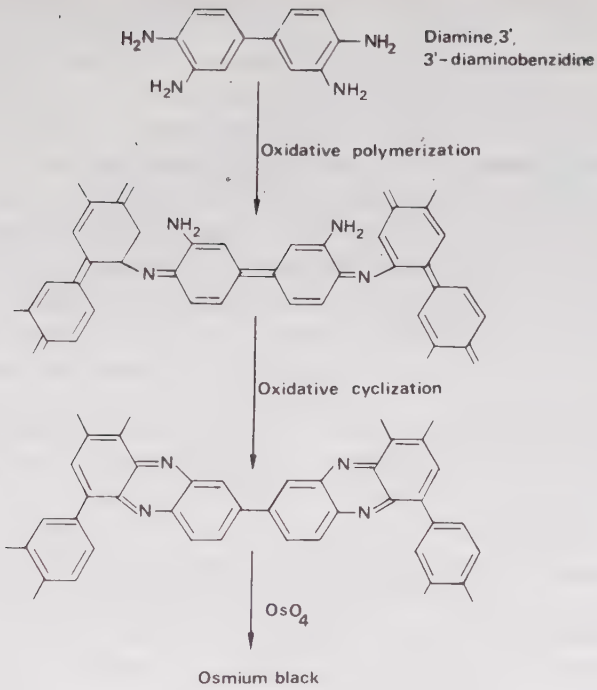



Abb. 3: Oxidation von DAB bei Anwesenheit von $H_2O_2$ und Meerrettich-Peroxidase (nach Seligman et al., 1968).

Inkubation der Azini mit DAB und $H_2O_2$:

Nach der Pulsmarkierung der Azini mit L-(4,5-$^3$H)-Leucin (s. 2.4.6.1.), wurden während der Chase-Periode Proben entnommen, bei 70xg in der Labofuge II (Heraeus Christ) 30 sec zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Azini in 1% Glutaraldehyd 30 min bei 20°C vorfixiert.

Bei geringer Glutaraldehyd-Konzentration und kurzer Fixationsdauer bleibt ein Teil der Peroxidaseaktivität in den Azini erhalten (Herzog und Fahimi, 1976). Anschließend wurden die Azini 3x in 0,1 M Tris-HCl pH 7,6 gewaschen und bei 25°C 2 h in 10 ml DAB-Reagens (s. 2.4.2.4.) in Dunkelheit vorinkubiert. Diese Vorinkubation ist wegen der langsamen Penetration des DAB erforderlich und wird in Dunkelheit wegen der Lichtempfindlichkeit und der damit verbundenen Autoxidation von DAB durchgeführt. Erst nach dieser Vorbehandlung werden die Azini mit $H_2O_2$ in frisch angesetzter DAB-Lösung im Schüttelwasserbad bei 37°C und 60 Agitationen/min 2 h bei Dunkelheit inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde nicht-oxidiertes DAB aus den Azini mit 0,1 M Tris-HCl pH 7,6 ausgewaschen und die Azinus-Präparation in $OsO_4$ (1% in $H_2O$) 1 h bei 4°C nachfixiert.

Inkubation von Tränendrüsengewebe in DAB + $H_2O_2$:

Gewebeteilchen der Lacrimalis wurden nach Perfusionsfixation (s. 2.4.5.1.) wie die Azini weiterbehandelt.

Cytochemischer Peroxidasenachweis mit PPD/PC:

Gewebeteilchen der Lacrimalis wurden nach Perfusionsfixation 30 min in 1% Glutaraldehyd bei 25°C fixiert, in 0,1 M Tris-HCl pH 7,6 gewaschen und 3 h in einer PPD/PC-Lösung (s. 2.4.2.5.) bei 25°C inkubiert. Dann wurden sie mit 0,1 M Tris-HCl pH 7,6 gewaschen und in $OsO_4$ (1% in $H_2O$ bidest.) 1 h bei 4°C nachfixiert.

## 2.4.4. Messung der Sauerstoffaufnahme durch isolierte Azini

Die Sauerstoffaufnahme isolierter Tränendrüsen-Azini wurde mit einer Clark-Elektrode in einer durchsichtigen 1,2 ml fassenden Kammer bei 37°C bestimmt. Die Azinus-Suspension wurde mit einem Magnetrührer gerührt. Zugaben von Sekretagoga erfolgten mit µl-Spritzen (Hamilton). Zwei Signale konnten aufgezeichnet werden:
1. Signal proportional zur Sauerstoffkonzentration $[O_2]$ und
2. Signal proportional zur Sauerstoffaufnahme $(d[O_2]/dt)$.
Die Sauerstoff-Elektroden und der Verstärker wurden von Dr. Schwab vom SFB 51 entworfen und konstruiert.

In den meisten Fällen wurden zwei Kammern benützt, um den Effekt von Sekretagoga und/oder Inhibitoren gleichzeitig mit der Ruherate vergleichen zu können (Schmidt et al., 1980). Mit dieser Technik konnten die Unterschiede des Sauerstoffverbrauchs pro min mit und ohne Stimulation gemessen werden. Isolierte Azini wurden in einer Konzentration, die 7-14 µg DNS oder $10^6$-$10^{12}$ Zellen entsprach, in die Kammern übertragen. Sobald der Sauerstoffverbrauch in beiden Kammern konstant war, wurden die Testsubstanzen zugegeben und die größte Abweichung von der Ruherate für spätere Berechnungen verwendet. Nach den Versuchen wurden die Suspensionen beider Kammern 5 min in der Centrifuge (Eppendorf) zentrifugiert und der DNS-Gehalt bestimmt. Der $O_2$-Verbrauch wurde in nmol $O_2$ x (µg DNS)$^{-1}$ x min$^{-1}$ oder nmol $O_2$ x min$^{-1}$ ausgedrückt. Änderungen des Sauerstoffverbrauchs wurden durch einen Stimulationsquotienten angegeben:

$$q = \frac{d[O_2]/dt \text{ nach Stimulation}^{+)}}{d[O_2]/dt \text{ ohne Stimulation (= Ruherate)}}$$

---

+) beinhaltet auch die "Entkopplung" mit DNP und die Hemmung.

## 2.4.5. Mikroskopie

### 2.4.5.1. Gewebepräparation nach Perfusions-Fixierung

Im Vergleich zur Gewebeentnahme mit anschließender Immersions-Fixation verspricht die Perfusionsfixation des Gewebes bessere Erhaltung der Zell- und Gewebestruktur. Da eine direkte Perfusion der Tränendrüsen wegen der kleinen Blutgefäße schwierig ist, wurde der ganze Oberkörper in die Perfusion miteinbezogen. In Äthernarkose wurde den Ratten 36 mg Chloralhydrat pro 100 g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Das Herz wurde durch Öffnen des Brustkorbes freigelegt. Nach Insertion einer Kanüle in den linken Ventrikel wurde eine 0,9%ige NaCl-Lösung mit einem Druck von 120 mm Hg zum Herausspülen der roten Blutkörperchen infundiert. Gleichzeitig wurde der rechte Vorhof inzidiert und die Aorta descendens und Vena cava dicht oberhalb des Zwerchfells abgeklemmt. Sobald aus dem rechten Vorhof nur noch klare Flüssigkeit austrat (etwa nach 1 min), wurde mit 3% Glutaraldehyd und 1% Formaldehyd (Karnovsky, 1965) 10 min bei Raumtemperatur und gleichem Perfusionsdruck weiterinfundiert. Danach wurden die Tränendrüsen entnommen, mit einer Rasierklinge in kleine Stücke geschnitten, 30 min bei Raumtemperatur und 1,5 h bei $4^{o}C$ in demselben Fixationsmittel weiterfixiert. Anschließend wurden die Gewebeteilchen in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,2 gewaschen und in 1% Osmiumtetroxid ($OsO_4$) nachfixiert.

Eine bessere Kontrastierung von Zellstrukturen (i.e. Membranen, Mikrotubuli) wurde außerdem mit folgenden Methoden erreicht:

Kontrastierung mit reduziertem Osmium:

$OsO_4$ wurde nach einer halben Stunde durch Zugabe von 15 mg/ml $K_4[Fe(CN)_6]$ x 3 $H_2O$ zur Erhöhung des Membrankontrastes im elektronenmikroskopischen Bild (Karnovsky, 1971) reduziert.

Uranylkontrastierung:

Nach der $OsO_4$-Fixierung wurde 1 h bei Raumtemperatur in 1% Uranylacetat pH 5,0 'en bloc' kontrastiert (Farquhar und Palade, 1965).

Färbung mit Tannin:

(a) Immersionsfixation:

Nach der Fixierung mit Glutaraldehyd wurde in 0,1 M HCl-Na-Arsenat-Puffer pH 7,2 gewaschen und in 2% Tanninsäure (Futaesaku et al., 1972; Mizuhira und Futaesaku, 1971) 2 h bei Dunkelheit und Raumtemperatur fixiert. Tannin bewirkt eine gute Membran- und Mikrotubuli-Kontrastierung. Diese wird durch einen 'Beizeffekt' des Tannins zusammen mit $OsO_4$ erreicht (Simionescu und Simionescu, 1976 a, b). Wegen der schlechten Penetration von Tannin wurden die Proben auch in einer Mischung aus 3% Glutaraldehyd und 1% Tanninsäure 30 min bei Raumtemperatur und 90 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert und dann mit 1% $OsO_4$ (in $H_2O$ bidest.) nachfixiert.

(b) Perfusionsfixation:

Gleichmäßigere Membrankontrastierung wurde durch Perfusionsfixation des Tränendrüsengewebes mit einer Mischung aus 3% Glutaraldehyd und 1% Tanninsäure erreicht.

Nach der Fixierung und (Nach-)Kontrastierung wurden die Proben in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und über Propylenoxid in Epon 812 (Luft, 1961) überführt und 24 h bei 36°C und 24 h bei 60°C polymerisiert.

2.4.5.2. Lichtmikroskopie

0,2-0,5 µm dicke Schnitte wurden am LKB Ultrotome III (LKB Produkter, Stockholm, Schweden) mit Glasmesser angefertigt und mit 1% Azur II und 1% Methylenblau in 1% Boraxlösung (Richardson, 1960) gefärbt und im Zeiss Ultraphot III untersucht und photographiert.

2.4.5.3. Elektronenmikroskopie

Ultradünnschnitte wurden mit einem Diamantmesser der Fa. Diatome (Buchs, Schweiz) am LKB-Ultrotome angefertigt, mit 7,5%iger Mg-Uranylacetat-Lösung (Fraska und Parks, 1965) und mit Blei nach Reynolds (1963) oder nach Venable und Coggeshall (1965) nachkontrastiert und im Siemens Elmiskop I untersucht. Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde Ilford Technical Film, für die Entwicklung Ilford PQ Universal und für die Fixierung der Aufnahmen Ilfofix verwendet.

2.4.6. Autoradiographie

Die Azinus-Isolierung wurde in leucinfreiem Eagle's Medium (Gibco 189) durchgeführt. Die resultierende Suspension isolierter Azini wurde in 1 ml Medium (Gibco 189) mit 500 µCi/ml L-(4,5-$^{3}$H)-Leucin (spezifische Aktivität: 59 Ci/mMol) 2 min bei 37°C inkubiert ('Pulse'). Darauf wurden die Azini in mit 4 mM ($^{1}$H)-Leucin angereichertes Medium (Gibco 109; 'Chase') überführt (Schüttelwasserbad: 37°C, 60 Agitationen/min). Ein Teil der

Suspension wurde nach 70 min mit $10^{-5}$M Carbachol stimuliert. Nach 0, 30, 60, (90), 120 min wurden Proben entnommen, fixiert und pelletiert oder in suspendiertem Zustand in DAB-Medium (s. 2.4.2.4.) inkubiert. Alle Proben wurden wie in 2.4.5.1. beschrieben in Epon eingebettet. Für die autoradiographische Lokalisation radiomarkierter Proteine wurde die 'flat substrate'-Technik (Salpeter und Bachmann, 1972) mit Ilford L4 als Emulsion gewählt.

2.4.6.1. Lichtmikroskopische Autoradiographie

Für die lichtmikroskopische Autoradiographie wurden 0,2-0,5 µm dicke Schnitte angefertigt und ungefärbt auf gereinigte Objektträger übertragen. Die Beschichtung der Schnitte mit der Photoemulsion wird unter 2.4.6.2. beschrieben.

2.4.6.2. Elektronenmikroskopische Autoradiographie

Gereinigte Mattschild-Objektträger wurden mit 0,75% Parlodion (= Kollodium; gelöst in Essigsäure-n-amylester) überzogen. 800 Å dicke Ultradünnschnitte mit silber-goldener Interferenzfarbe wurden auf die Objektträger übertragen, 4 h mit Mg-Uranylacetat kontrastiert und mit einer 50 Å dicken Kohleschicht im Balzers'-Niedrig-Vakuum-Kohlebedampfungsgerät (Fa. Balzers, München) bedampft. Dann wurden die Schnitte in der Dunkelkammer (bei Raumtemperatur und etwa 50% Luftfeuchtigkeit) mit 1:3 verdünnter Ilford L4-Emulsion (45°C) beschichtet. Dazu wurden 500 µl der Emul-

sion über den Schnitten aufgetragen und nach 35-40 sec dekantiert. Sobald die auf dem Objektträger verbleibende Emulsion angetrocknet war, wurden die Objektträger zusammen mit Blaugel in lichtdichte Kunststoffbehälter verpackt und bei 4°C im Kühlschrank exponiert. Die Expositionszeit betrug für die Lichtmikroskopie 1-3 Tage, für die Elektronenmikroskopie je nach Entwicklungsmethode 3 Tage bis 5 Wochen.

Die Autoradiographien wurden hauptsächlich mit Kodak D 19b zur quantitativen und mit GAE (Modifikation nach Wisse und Tates, 1968) zur qualitativen Auswertung entwickelt. Zusätzlich wurde der Phenidon-Entwickler nach Lettré und Paweletz (1966) auf seine Eigenschaften untersucht und die autoradiographischen Ergebnisse mit denen nach D 19b und GAE (Elon) verglichen. Bei dem Entwickler D 19b handelt es sich um einen "chemischen Entwickler"[+)], bei dem die lichtmikroskopisch erkennbaren Silberkörner im Elektronenmikroskop als gewundene Fadenstrukturen in Erscheinung treten. Dagegen sind Phenidon und Elon "physikalische Entwickler"[+)], bei denen die Silberkörner im Licht- und im Elektronenmikroskop als Punkte erscheinen. Wegen der geringeren Sensitivität beider Entwickler werden die für die Elektronenmikroskopie beschichteten Objektträger nach der Expositionszeit erst mit Goldsalzen z.B. mit Goldchlorid vorbehandelt (Goldlatensifikation; James, 1948; Salpeter und Bachmann, 1964; Ginsel et al., 1979).

---

[+)] Diese in der Literatur über Autoradiographie übliche Charakterisierung ist irreführend, da alle 3 Entwickler aufgrund der in der Photographie gebräuchlichen Definition chemische Entwickler sind. Nur die Exposition von Photoemulsionen in Lösungen mit Silbersalzen wird als physikalische Entwicklung bezeichnet. Diese ist in der licht- und elektronenmikroskopischen Autoradiographie unüblich (Williams, 1977).

Mit dieser Methode können angeregte, sonst 'latent' bleibende Silberbromidmoleküle zusätzlich zu Silberkörnern reduziert und sichtbar gemacht werden. Dabei erhöht sich die Sensitivität dieser Entwickler um das 3-4fache. Die photographische Behandlung der genannten Entwicklungsmethoden ist in Tabelle III zusammengefaßt.

Tabelle III: Verschiedene Entwicklungsmethoden der Ilford L4-Emulsion

| | Goldlatensifikation min | $H_2O$ bidest sec | Entwicklung min | 3% Essigsäure sec | Fixierbad min | $H_2O$ bidest min | Temperatur $^oC$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| D 19b | -- | -- | 2 | 10 | 1 | 2x15 | 20 |
| GAE | 5 | 30 | 7,5 | 10 | 2 | 2x15 | 18 |
| Phenidon | 5 | 30 | 1 | 10 | 5 | 2x15 | 20 |

Als Fixierlösung wurde 0,4 M $Na_2SO_4$ und 0,06 M $K_2S_2O_5$ in $H_2O$ verwendet. Vor der lichtmikroskopischen Betrachtung wurden die Schnitte in Eukitt eingedeckt. Für die elektronenmikroskopische Auswertung wurden die Schnitte zusammen mit der Parlodionschicht auf einer Wasseroberfläche abflottiert und auf Kupfernetzchen (= 200 'mesh') übertragen. Anschließend wurden sie mit Mg-Uranylacetat 5 min und mit Bleicitrat (Venable und Coggeshall, 1965)3 min nachkontrastiert und im Elektronenmikroskop untersucht.

2.4.6.3. Quantitative Auswertung der Autoradiogramme

Von jedem Entnahmezeitpunkt (nach der Pulsmarkierung) wurden von 2-4 Blöcken aus vier verschiedenen Experimenten Ultradünnschnitte angefertigt und im Elmiskop I (Siemens) bei 80 kV bei 2 000 bis 3 000 facher Vergrößerung photographiert (Endvergrößerung 8 000 - 10 000 x).

Morphometrische Analyse: Mit dem MOP-AMO 3 (Fa. Kontron, Eching/München) wurden die Gesamtflächen der Zellen, die Flächen des basalen und distalen Cytoplasmas, des Golgi-Komplexes, des Zellkernes, der Mitochondrien und Lysosomen bestimmt. Die Gesamtzahl der Silberkörner pro Zelle und die Zahl der Silberkörner über den aufgezählten Zellbereichen und Kompartimenten wurde ermittelt, wobei die Zuordnung der Silberkörner durch die Bestimmung ihres Zentrums über den darunterliegenden Zellstrukturen erfolgte.

2.4.7. DNS-Bestimmung

Die DNS-Bestimmung erfolgte nach der Methode von Burton (1956) unter Benutzung von Kalbsthymus-DNS als Standard.

2.4.8. Statistik

Summierte Daten wurden grundsätzlich als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben (s. Sauerstoff-Verbrauchsmessung). Bei genügend hoher Proben- bzw. Versuchsanzahl wurden die Verteilungen mit dem $\chi^2$-Test auf ihre Zufälligkeit überprüft (s. speziell Autoradiographie). Die Vertrauensgrenzen werden im Teil Ergebnisse angegeben.

# 3. ERGEBNISSE

## 3.1. Struktur isolierter Azini

Isolierte Azini bestehen wie die Azini in situ aus einer einschichtigen Lage von 6-8 Zellen. Die Azinus-Zellen haben die Form stumpfer Pyramiden, deren Apices das Azinus-Lumen begrenzen. Sie besitzen neben ihrer Polarität alle Charakteristika exokriner Zellen (Abb. 4): ein reichlich vorhandenes rauhes endoplasmatisches Retikulum (RER), dessen Zisternen zum Teil parallelgeschichtet sind. In der Nähe des Golgi-Apparates sind die Membranen des RER teilweise frei von Ribosomen. Diese Abschnitte werden als 'transitional elements' (Palade, 1975) bezeichnet. Der Golgi-Apparat besteht aus 4-6 parallel geschichteten und vielfach gewundenen Zisternen sowie angrenzenden Feldern mit peripheren Vesikeln. Auf der trans-Seite des Golgi-Apparates (zum Azinus-Lumen hin) erkennt man verschieden große (0,4 bis 1,1 µm, Ø) kondensierende Vakuolen (Palade, 1975). Reife Sekretgranula füllen das apikale Drittel der Zelle aus. Es werden 2 Granula-Typen unterschieden (Scott und Pease, 1959): 1,2-1,5 µm große Granula mit einem Inhalt geringer Elektronendichte und kleinere 0,8 µm große Granula mit dichterem und homogenen Inhalt. Beide Granula-Typen sind jeweils in etwa der Hälfte aller Azinus-Zellen enthalten, kommen aber selten zusammen in einer Zelle vor (Abb. 4). In das Lumen ragen unregelmäßig angeordnete Mikrovilli. Das Lumen ist durch 'tight junctions' (zonulae occludentes) gegen den Interzellularspalt benachbarter Drüsenendstückzellen abgedichtet. Mit der Gefrierätztechnik können 'gap junctions' dargestellt werden, die die Drüsenendstückzellen eines Azinus untereinander verbinden. Außerdem sind die lateralen Plasma-Membranen benachbarter Zellen durch fingerförmige Fortsätze untereinander verzahnt und durch 'Desmosomen' oder 'maculae adhaerentes' verhaftet.

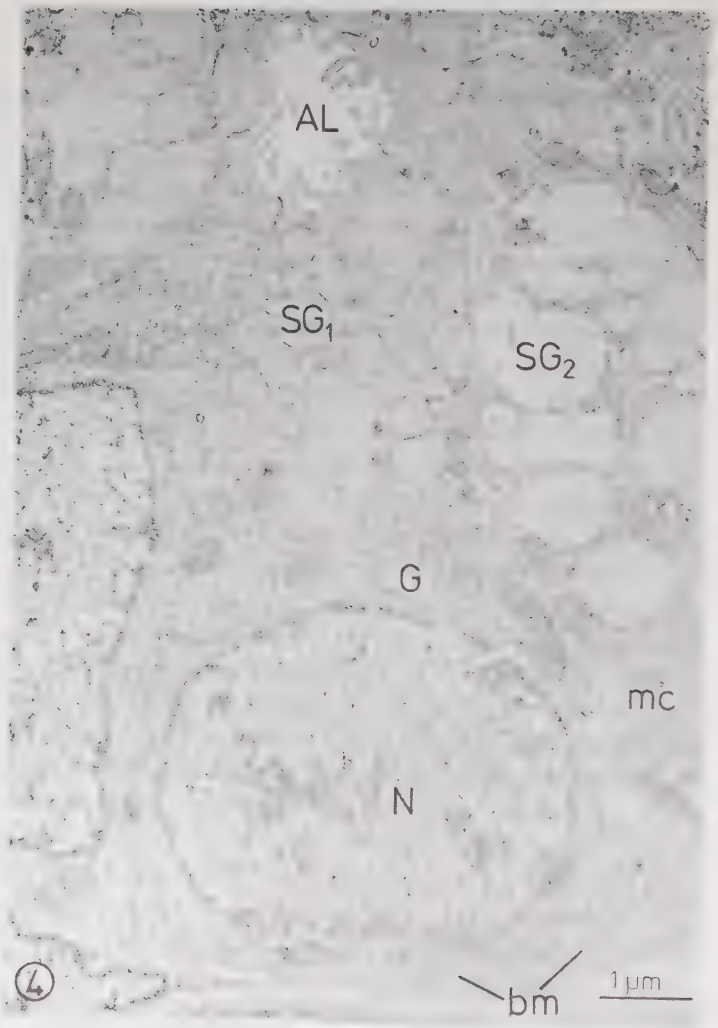



Abb. 4: Ausschnitt aus einem Azinus der Tränendrüse (gl. extraorbitalis) einer 10 Tage alten Ratte. Der Zellkern (N) liegt an der Basis der pyramidenförmigen sekretorischen Drüsenzelle und ist umgeben von Zisternen des Rauhen Endoplasmatischen Retikulums (RER). Der Golgi-Apparat (G) liegt über dem Zellkern. Zwei Typen von Sekretgranula ($SG_1$: Ø 0,8 µm und $SG_2$: Ø 1,2-1,5 µm) füllen den apikalen Raum der Zelle. Mikrovilli ragen in das Drüsenlumen (AL) hinein. Eine Myoepithelzelle (mc) liegt zwischen Basalmembran (bm) und Drüsenzelle. Vergrößerung: 16 500 x.

Isolierte Azini zeigten licht- (Abb. 5) und elektronenmikroskopisch längere Zeit (bis zu 5 h) keine morphologischen Veränderungen und blieben auch funktionell intakt (3.2.4.). Später waren im Lichtmikroskop die ersten Schädigungen der Azini und Zellen (Cytoplasmaausstülpungen ('blebs')) erkennbar. Weitergehende Schädigungen wurden im Elektronenmikroskop sichtbar: Die Polarität der exokrinen Drüsenzelle ging verloren. Außerdem wurden Vesikulation des RER und der Golgi-Zisternen, Kernpyknose und große (10-15 ,um Ø) Vakuolen sichtbar.

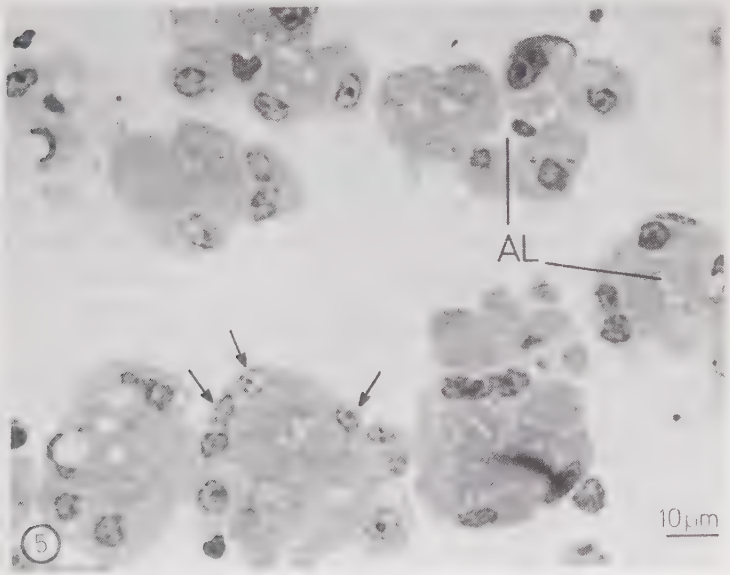



Abb. 5: Isolierte Azini nach Verdauung des Bindegewebes mit Collagenase. Die Endstückzellen sind wie in situ um ein zentrales Lumen (AL) angeordnet. Die Polarität der Azinuszellen bleibt erhalten und ist ersichtlich aus den an der Zellbasis liegenden Zellkernen (Pfeile). Schnittdicke: 1µm. Vergrößerung: 990 x.

## 3.2. Biochemische und Physiologische Ergebnisse

### 3.2.1. Einbau von L-(4,5-$^3$H)-Leucin in Azini

Bei Inkubation von Tränendrüsen-Azini in ($^3$H)-Leucin wird bis zu 2 h eine lineare Aufnahme der Aktivität des markierten Leucins beobachtet. Abb. 6 zeigt die Abnahme der Aktivität im Inkubations-Medium und die gleichzeitige Aufnahme (% der Gesamtaktivität) in den Azini. Die lineare Aufnahme von ($^3$H)-Leucin entspricht früheren Befunden an isolierten Azini der Tränendrüse, bei der die Inkorporationsrate 100-150 nmol Leucin x(mg DNA)$^{-1}$x h$^{-1}$ beträgt (Herzog und Farquhar, 1977). Die lineare Aufnahme von ($^3$H)-Leucin durch die Azini zeigt, daß sie über längere Zeit funktionsfähig sind und der sekretorische Prozeß ohne größere Einschränkung abläuft. Nach mehr als 2 h der ($^3$H)-Leucin-Aufnahme geht diese Linearität verloren. Aus den Ergebnissen der autoradiographischen Untersuchungen wissen wir allerdings, daß nach 2 h die ersten radiomarkierten Proteine in das Lumen abgegeben werden, woraus sich der Verlust der Linearität bei der Inkorporation von ($^3$H)-Leucin erklären könnte.

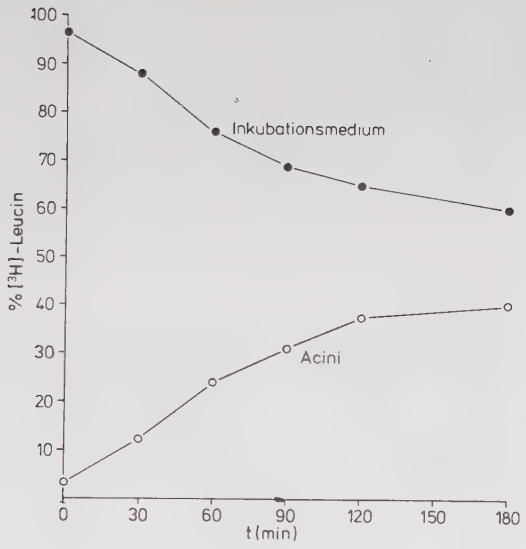



Abb. 6: Einbau von L-(4,5-$^{3}$H)-Leucin in isolierte Tränendrüsen-Azini und gleichzeitige Abnahme der Radiomarkierung im umgebenden Kulturmedium. Bis zwei Stunden ist die Leucin-Aufnahme linear und nimmt danach wegen der beginnenden Sekretion radiomarkierter Proteine ab. (100% ($^{3}$H)-Leucin entsprechen einer Leucinkonzentration von 0,5 µM).

3.2.2. Peroxidase-Sekretion isolierter Azini

Isolierte Azini wurden mit oder ohne Sekretagoga oder Atropin inkubiert. Nach 5, 30, 60 und 90 min wurden Proben entnommen und die Peroxidase-Aktivität im Inkubationsmedium mit DAB colorimetrisch bestimmt. Abb. 7 zeigt die Peroxidase-Sekretion isolierter Azini:

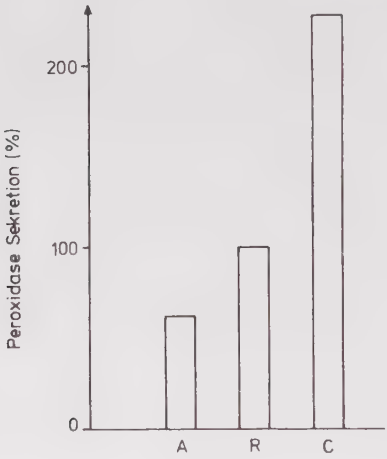



Abb. 7: Sekretion von Peroxidase aus isolierten Azini der Tränendrüse. R: Ruhesekretion (=100%); A: Peroxidase-Sekretion nach Hemmung mit $10^{-4}$ M Atropin(=63%); C: Peroxidase-Sekretion nach Stimulation der Azini mit $10^{-5}$ M Carbachol (=225%). Dargestellt sind die Mittelwerte von 8 Einzelmessungen aus 2 verschiedenen Azinuspräparationen nach einer Sekretionsdauer von 90 min.

Nach Stimulation mit $10^{-5}$M Carbachol erhöht sich die Peroxidase-Sekretion auf 225%, nach Inkubation in $10^{-4}$M Atropin sinkt die Sekretion auf 63% gegenüber der Sekretion unstimulierter Azini. Die Sekretion unstimulierter Azini entspricht der Ruhesekretion. Nach Inkubation der Azini in Atropin müßte die Sekretion größtenteils blockiert sein. Trotzdem wird noch Peroxidase freigesetzt. Dies könnte durch Diffusion intrazellulärer Peroxidase aus geschädigten Azinus-Zellen oder durch Entleerung von Restsekret aus den Lumina erklärt werden.

### 3.2.3. IEF-Gelelektrophoretische Untersuchungen des Tränendrüsensekretes

Nach Stimulation mit Carbachol wurden sekretorische Proteine in das umgebende Medium freigesetzt und mit der IEF-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie Blue gefärbt oder zur Peroxidase-Darstellung in DAB + $H_2O_2$ oder in PPD/PC + $H_2O_2$ inkubiert. Abb. 8 zeigt, daß die endogene Peroxidase der Tränendrüse ein anionisches Protein ist, welches in mehreren Banden zwischen pH 4,6 und 6,8 auftritt (DAB-Reaktion). In diesem pH-Bereich ist nur ein sehr geringer Anteil sekretorischer Proteine im IEF-Gel mit Coomassie Blue dargestellt.

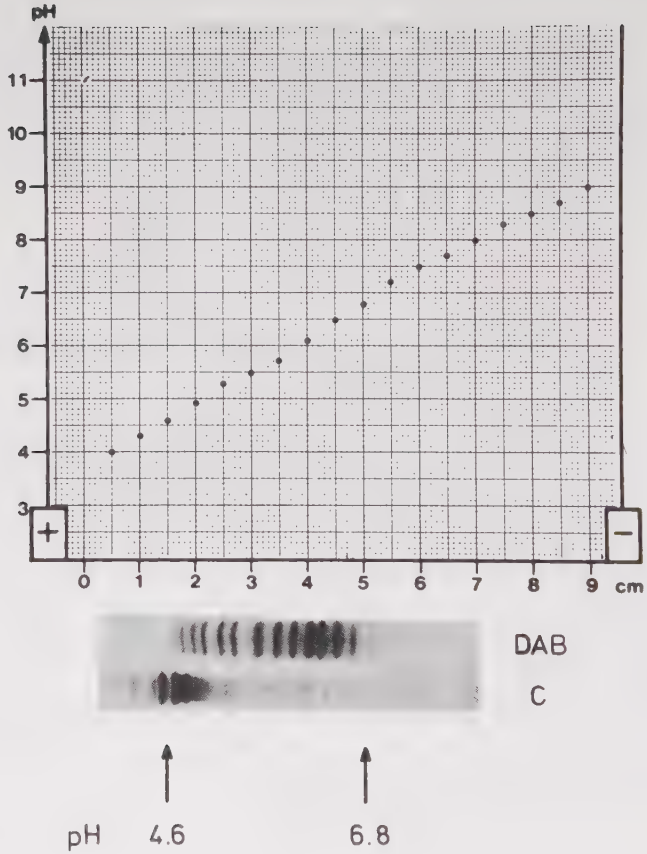



Abb. 8: IEF-Gel-Elektrophorese. Nachweis der nach Carbachol-Stimulation der Azini ins Inkubationsmedium abgegebenen Peroxidase mit DAB und $H_2O_2$. Die sekretorische Peroxidase stellt sich in 12 Banden im anionischen Bereich zwischen pH 4,6 und 6,8 dar (DAB). Sie hat nur einen geringen Anteil am gesamten sekretorischen Protein und läßt sich mit Coomassie Blue R brillant (C) im Gegensatz zu den übrigen sekretorischen Proteinen, die noch anionischer sind (C), nur schwach sichtbar machen.

### 3.2.4. Sauerstoffverbrauch isolierter Azini

Der Sauerstoff-Verbrauch isolierter Azini wurde mit und ohne Stimulation gemessen. Die Stimulierbarkeit erwies sich als ein Kriterium für die Vitalität der Azinus-Präparation.

1. Ruheraten

In 63 Experimenten (7 Isolationen) wurde eine mittlere Ruherate der isolierten Azini von

$$0{,}43 \pm 0{,}09 \text{ (S.D.) nmol } O_2 \times (\mu g \text{ DNS})^{-1} \times \text{min}^{-1}$$

erhalten. Die Ruheraten variierten zwar von Experiment zu Experiment, blieben aber innerhalb der hier beschriebenen Experimente mindestens 2 h konstant und waren proportional zum Volumen der angebotenen Azinus-Suspension oder zum entsprechenden DNS-Gehalt.

2. Sauerstoffverbrauch nach Stimulation mit Carbachol

Die isolierten Azini wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Carbachol stimuliert. Tabelle IV zeigt die entsprechenden q-Werte (Stimulationsrate/Ruherate):

Tabelle IV

| C | $q = \frac{\text{Stimulationsrate}}{\text{Ruherate}} \pm$ S.D. | n |
|---|---|---|
| $10^{-2}$ M | 1,17 ± 0,11 | 8 |
| $10^{-3}$ M | 1,31 ± 0,17 | 10 |
| $10^{-4}$ M | 1,36 ± 0,15 | 11 |
| $10^{-5}$ M | 1,28 ± 0,09 | 10 |
| $10^{-6}$ M | 1,05 ± 0,05 | 7 |

SD: Standardabweichung, C: Konzentrationen,
n: Anzahl der Experimente.

Für alle weiteren Versuche wurde Carbachol in Konzentrationen von $10^{-4}$M und $10^{-5}$M verwendet. Zugabe von Isoproterenol ($10^{-3}$M - $10^{-5}$M) bewirkte keine Erhöhung des Sauerstoff-Verbrauches.

3. Hemmung der Sauerstoffaufnahme

Zugabe von $10^{-4}$M Atropin nach Stimulation mit Carbachol verminderte den erhöhten Sauerstoffverbrauch auf das Niveau der Ruherate (Abb. 9 d). Der Effekt von Atropin beweist die muscarinartige Wirkung des Carbachols auf die Drüsenendstückzelle der Tränendrüse.

4. Wirkung von DNP auf den Sauerstoffverbrauch isolierter Azini

Der durch Carbachol induzierte Sauerstoffmehrverbrauch der Azini in Suspension konnte durch Zugabe von $10^{-4}$M DNP noch erhöht werden. Abb. 9 a zeigt den Kurvenverlauf. Die Zuwachsrate betrug:

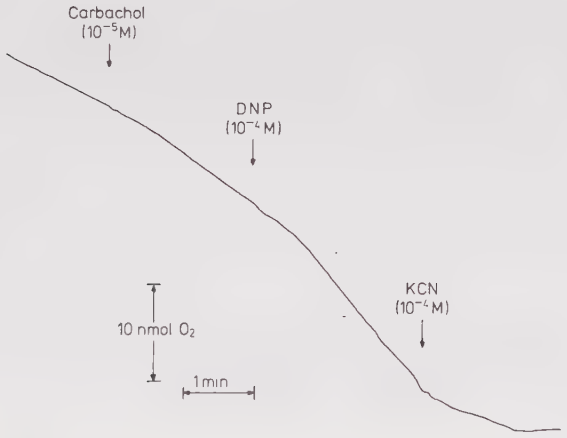
Ruherate: Carbachol : DNP = 1 : 2,25 : 3,5
oder : Carbachol : DNP = 1 : 1,6

Der Sauerstoffverbrauch von Azini, die bereits 4 h mit $10^{-5}$ M Carbachol stimuliert waren, ließ sich durch erneute Gabe von $10^{-5}$M Carbachol nicht mehr, durch Zugabe von $10^{-4}$M DNP jedoch wieder um den Faktor 1,6 erhöhen (Abb. 9 c). Dagegen läßt sich durch $10^{-4}$M DNP induzierter Sauerstoffmehrverbrauch durch Zugabe von $10^{-5}$M Carbachol nicht mehr erhöhen (Abb. 9 b). Da die Effekte von DNP auch an isolierten Mitochondrien beobachtet werden (Chance und Williams, 1972), sind sie kein Vitalitätskriterium für lebende Zellen.

## 5. $O_2$-Verbrauch als Vitalitätskriterium

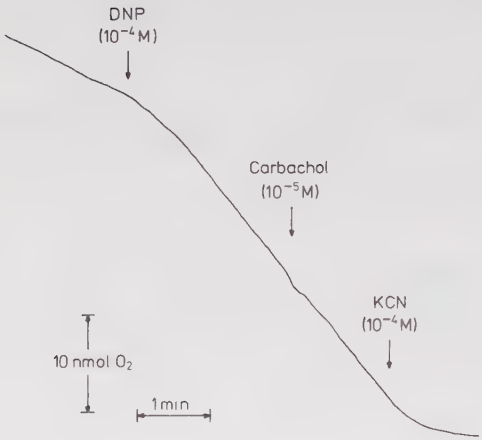
Isolierte Azini wurden neben ihrer morphologischen auch auf ihre funktionelle Intaktheit überprüft. Diese wurde durch Messung des Sauerstoffverbrauchs vor (Ruherate) und nach Stimulation mit Carbachol getestet. Durch Zugabe von KCN wurde der $O_2$-Verbrauch sofort gestoppt. Abb. 9 d zeigt den typischen Kurvenverlauf.

Abb. 9: Sauerstoffverbrauch isolierter Tränendrüsen-Azini (Vitalitätskriterium)



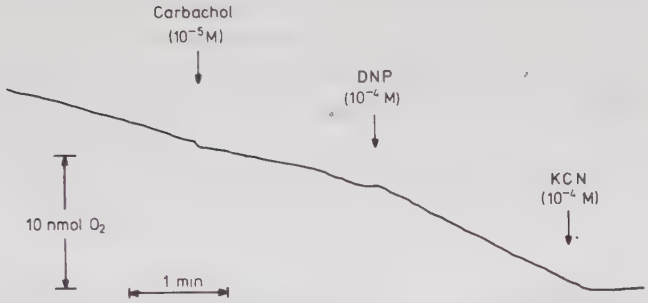

(a) Der Ruhe-$O_2$-Verbrauch (Ruherate) steigt nach Stimulation mit $10^{-5}$M Carbachol um ca. 30%. Durch Zugabe von $10^{-4}$M Dinitrophenol (DNP) wird der $O_2$-Verbrauch nochmals erhöht.

Abb. 9: Sauerstoffverbrauch isolierter Tränendrüsen-Azini (Vitalitätskriterium)

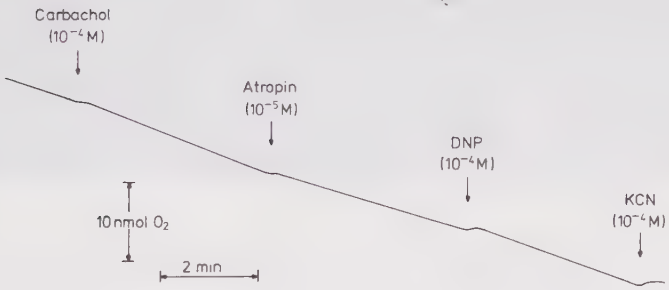



(b) Wird die Atmung isolierter Azini durch DNP stimuliert, kann die $O_2$-Aufnahme durch anschließende Zugabe von Carbachol nicht mehr erhöht werden.

Abb. 9: Sauerstoffverbrauch isolierter Tränendrüsen-Azini (Vitalitätskriterium)




(c) Nach 4 h Stimulation des $O_2$-Verbrauches isolierter Azini mit Carbachol führt erneute Zugabe von Carbachol zu keiner weiteren Erhöhung der $O_2$-Aufnahme, während die stimulierende Wirkung von DNP nicht beeinflußt wird.




(d) Typischer Kurvenverlauf der $O_2$-Aufnahme isolierter Tränendrüsen-Azini nach Zugabe von Carbachol, Atropin, DNP und KCN (= Vitalitätskriterium). Atropin senkt die durch Carbachol erhöhte $O_2$-Aufnahme wieder auf das Niveau der Ruherate. KCN unterbindet jegliche Atmung (vgl. auch 9 (a) - (c)).

## 3.3. Cytochemische Ergebnisse

### 3.3.1. Peroxidaselokalisation im Tränendrüsen-Gewebe

Tränendrüsen-Peroxidase wurde im Gewebe nach einer Modifikation (Herzog und Fahimi, 1973) der DAB-Methode (Graham und Karnovsky, 1966) cytochemisch dargestellt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen (Abb. 10) zeigen dichtes Reaktionsprodukt in allen am intrazellulären Transport sekretorischer Proteine beteiligten Zellkompartimenten:

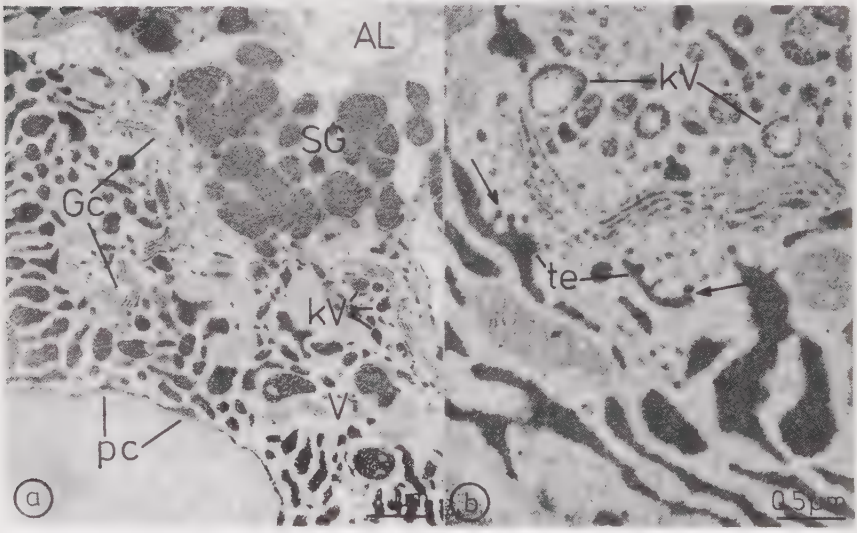



Abb. 10: Ausschnitt aus einem Tränendrüsen-Azinus (a) und einer Azinuszelle (b) nach Inkubation des Gewebes in DAB-Medium.
(a) Alle Zisternen des RER, einschließlich der perinucleären Zisterne (pc) enthalten Reaktionsprodukt. Dieses ist ebenfalls sichtbar in glattwandigen Vesikeln (v), Golgi-Zisternen (Gc), kondensierenden Vakuolen (kV) und Sekretgranula (SG). Vergrößerung: 12000 x.
(b) Gut sichtbar sind die von den 'transitional elements' (te) abtropfenden Vesikel (Pfeile). Bei den kondensierenden Vakuolen (kV) ist das Reaktionsprodukt an der Innenseite der Membran lokalisiert. Vergrößerung: 25000 x.

den Zisternen des RER einschließlich der perinukleären Zisternen, 'transitional elements', Golgi-Vesikel und Golgi-Zisternen, kondensierende Vakuolen und Sekretgranula. Cytoplasma und Zellkerne waren stets frei von Peroxidase. Reaktionsprodukt ist außerdem an den inneren und äußeren Membranen der Mitochondrien sichtbar. Dabei handelt es sich jedoch um die Aktivität anderer Hämproteine, z.B. der Cytochromoxidase (Herzog und Miller, 1972). Wie bei früheren Untersuchungen an der Tränendrüse der Ratte (Herzog und Miller, 1972), finden sich neben Peroxidase-positiven auch Peroxidase-negative Golgi-Komplexe. Wenn die Zisternen Peroxidase enthalten, ist die DAB-Reaktion schwächer als in den Zisternen des RER oder den Sekretgranula, nimmt jedoch stets von der cis- zur trans-Seite zu.

Neben DAB wurde auch PPD/PC als Wasserstoff-Donator auf seine Tauglichkeit zur cytochemischen Peroxidase-Darstellung überprüft. Die Osmiophilie des Reaktionsproduktes aus PPD/PC ist deutlich geringer als die des oxidierten DAB und führt daher zu weniger kontrastreicher Darstellung (Abb. 11).

Abb. 11: Ausschnitt aus einem Tränendrüsen-Azinus nach Inkubation des Gewebes in PPD/PC-Medium. Im Gegensatz zu Gewebe mit DAB-Reaktionsprodukt resultiert die Reaktion mit PPD/PC in unzureichendem Kontrast; diese Methode ist daher zur cytochemischen Darstellung ungeeignet. Vergrößerung: 12000 x.

### 3.3.2. Peroxidase-Lokalisation in Zellen isolierter Tränendrüsen-Azini

Grundsätzlich wird bei isolierten Azini (Abb. 12) dieselbe cytochemische Lokalisation beobachtet wie im Gewebe.

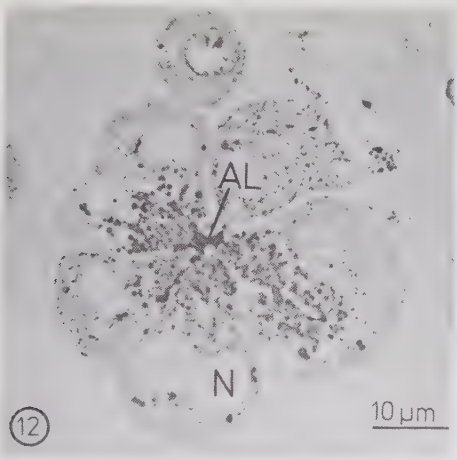



Abb. 12: Lichtmikroskopische Darstellung isolierter Azini nach Inkubation in DAB-Medium. Reaktionsprodukt wird im RER, in den Sekretgranula und im Lumen (AL) sichtbar. In den Kernen (N) findet sich kein Reaktionsprodukt. Schnittdicke: 0,25 µm. Vergrößerung: 1400 x.

Trotz der geringeren Diffusionsstrecke für DAB werden auch in den Drüsenendstückzellen isolierter Azini Peroxidase-positive und Peroxidase-negative Golgi-Zisternen und -Vesikel (Abb. 16-18, 24) beobachtet. Die Ursache für das Auftreten Peroxidase-positiver und -negativer Golgi-Elemente dürfte daher nicht auf unterschied-

liche Konzentrationen von DAB in der Zelle zurückzuführen, sondern vielmehr in der Regulation des Peroxidasetransports zu suchen sein. Bereits nach kurzer Stimulation (10 min) mit $10^{-5}$M Carbachol zeichnet sich eine Vergrößerung des Azinuslumens (Abb. 22 b) mit einem vermehrten Auftreten von Exocytosefiguren (Abb. 13) ab.

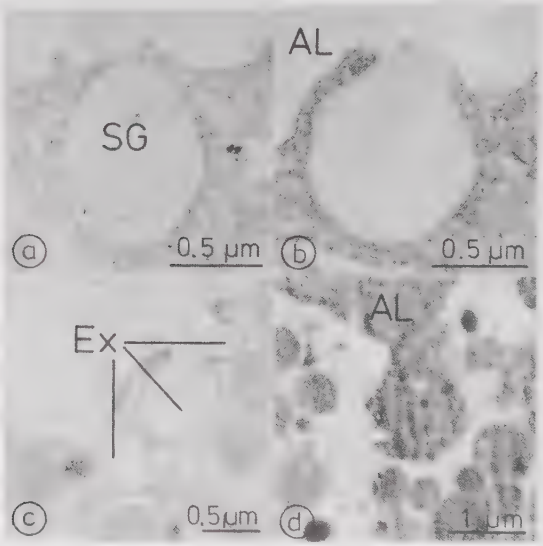



Abb. 13: Exocytose.
(a) Annäherung eines Sekret-Granulums an die apikale Plasmamembran. Vergrößerung: 21 000 x.
(b) Exocytotische Insertion der Sekret-Granulum-Membran in die apikale Plasma-Membran; beginnende Freisetzung des Granulum-Inhaltes. Vergrößerung: 36 000 x.
(c) Mehrere Exocytosefiguren. Vergrößerung: 21 000 x.
(d) Exocytotische Lakune aus einem in DAB-Medium inkubierten Azinus. Vergrößerung: 14 000 x.
AL, Azinus-Lumen; Ex, Exocytose; SG, Sekretgranula.

Wegen der angeregten Proteinsekretion verringert sich die Zahl der Sekret-Granula. Nach längerer Stimulation (50 min) findet man kaum noch Sekret-Granula, häufiger jedoch große Vakuolen. In seltenen Fällen beobachtet man in demselben Azinus Zellen, die auch nach längerer Stimulation kaum degranuliert sind (Abb. 14).

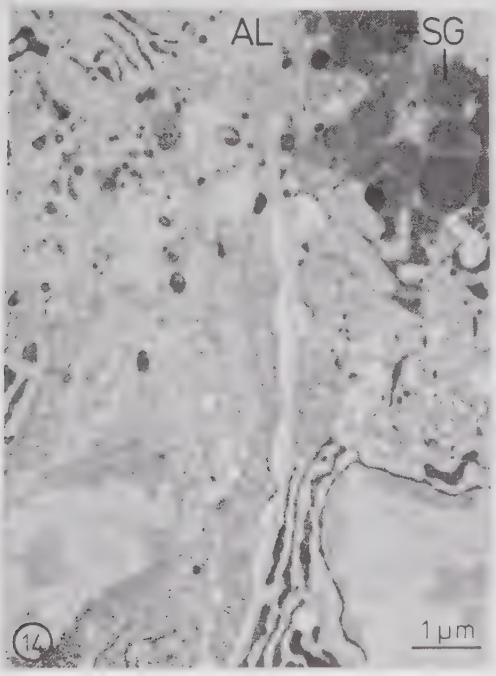



Abb. 14: Ausschnitt aus einem Tränendrüsen-Azinus nach 50 min Stimulation mit Carbachol und Inkubation in DAB-Medium. Die linke Zelle ist fast völlig degranuliert, während die rechte noch mit zahlreichen Granula (SG) angefüllt ist. AL, Azinus-Lumen. Vergrößerung: 13 000 x.

## 3.4. Autoradiographie

### 3.4.1. Lichtmikroskopische Autoradiographie

Lichtmikroskopische Autoradiogramme (Abb. 15) wurden nach einer Expositionszeit von 24 h untersucht. Kurz nach der Pulsmarkierung liegen die Silberkörner überwiegend nahe der Zellbasis. 60 min nach der Pulsmarkierung liegt die Mehrzahl der Silberkörner supranukleär. Nach 120 min erfolgt eine Konzentrierung in der apikal gelegenen Granularegion. Einige Silberkörner sind auch über dem Azinus-Lumen sichtbar. Der intrazelluläre Transport radiomarkierter Proteine von der Zellbasis zum Azinus-Lumen dauert daher 2 h. Es wurden keine Unterschiede im zeitlichen Ablauf dieses Transportes in verschiedenen Azini beobachtet. Aber die Intensität der Radiomarkierung kann wechseln: Es gibt Azini und Einzelzellen eines Azinus, die stärker oder schwächer als die Mehrzahl markiert sind.

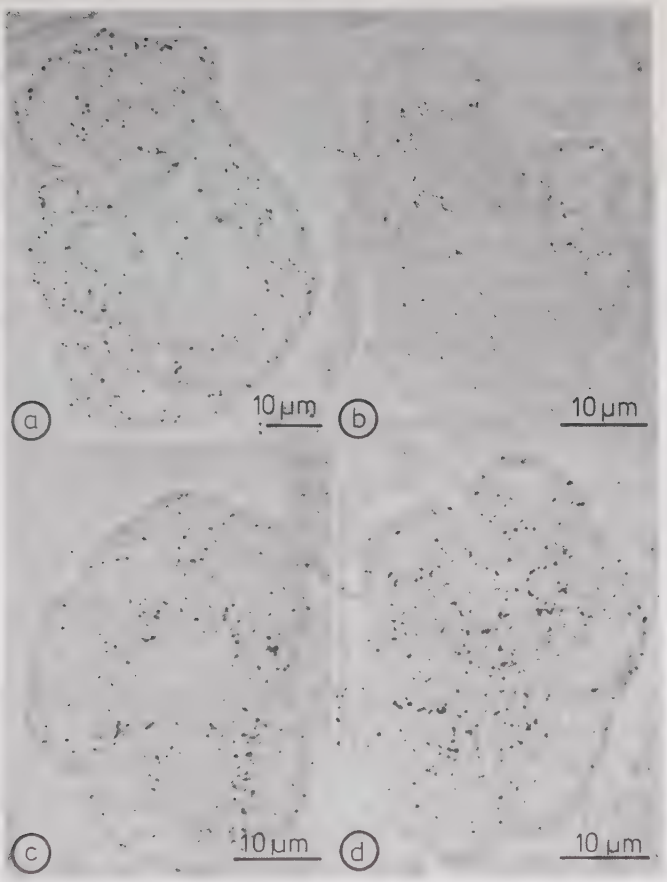



Abb. 15: Isolierte Azini der Tränendrüse nach Pulsmarkierung mit L-(4,5-$^{3}$H)-Leucin.
(a) 0 min nach Pulsmarkierung liegen die Silberkörner überwiegend nahe der Zellbasis.
(b) 30 min nach Pulsmarkierung liegen die Silberkörner über der Zellbasis und dem Golgi-Bereich.
(c) 60 min nach Pulsmarkierung erkennt man eine supranukleäre Konzentration der Silberkörner. Die periluminale Region ist weitgehend frei.
(d) 120 min nach Pulsmarkierung erfolgt eine Konzentrierung der Silberkörner im apikalen Bereich der Zelle und über dem Lumen.
Schnittdicke von (a) - (d): 0,5 µm.
Vergrößerungen: (a) 1000x, (b) 1600x, (c) 1600x, (d) 1700x.

### 3.4.2. Elektronenmikroskopische Autoradiographie

Nach einer Expositionszeit von 3 Tagen wurden die Autoradiogramme im Elektronenmikroskop untersucht. Am Beginn der Chase-Periode wurde die stärkste Radiomarkierung über dem basalen Cytoplasma beobachtet (Abb. 16); diese Region wird hauptsächlich vom RER eingenommen. Von 30 bis 60 min nimmt die Zahl der Silberkörner über dem RER ständig ab und über dem Golgi-Komplex zu (Abb. 17, 18). Nach 120 min erfolgt eine Konzentrierung der Silberkörner über den Sekret-Granula mit gleichzeitiger Abnahme über dem Golgi-Bereich (Abb. 19). Einige Silberkörner befinden sich bereits über dem Azinuslumen (Abb. 19 b) und geben einen Anhalt für die Größe der Ruhesekretion isolierter Azini.

### 3.4.3. Bestimmung der Silberkorndichte

Die Autoradiogramme wurden mit dem Kontron-Gerät MOP/AMO-3 ausgewertet. Die Ergebnisse der Tabelle VI zeigen eine wellenförmige Zu- und Abnahme der Silberkorndichte[+)] über sekretorischen Kompartimenten in der Reihenfolge: RER - → Golgi-Komplex - → Sekretgranula. Am Beginn der Chase-Periode wird über dem RER und nach 60 min über dem Golgi-Komplex ein Maximum der Silberkorndichte beobachtet. Im apikalen Cytoplasma, das neben geringen Anteilen von RER hauptsächlich Sekretgranula enthält, werden eine Abnahme am Beginn der Chase-Periode und zwischen 60 und 120 min eine stärkere Zunahme beobachtet. Der höhere Ausgangswert am Beginn der Chase-Periode läßt sich mit den RER-Anteilen im apikalen Cytoplasma erklären. Die Kinetik dieses Transportes radiomarkierter Proteine wird in Abb. 20 gezeigt.

---

[+)] Die Maximalwerte für jeden Zeitpunkt sind durch Unterstreichung und Grautönung hervorgehoben.

Tabelle VI: Verteilung von Silberkörnern in Tränendrüsen-Azinus-Zellen

| | A Pulse 2min + 0 min Chase | | | | B Pulse 2 min + 30 min Chase | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Silberkörner gesamt | Silberkörner % ± S.D. | Fläche % ± S.D. | Silberkörner pro $\mu m^2$ | Silberkörner gesamt | Silberkörner % ± S.D. | Fläche % ± S.D. | Silberkörner pro $\mu m^2$ |
| Basales Cytoplasma (RER) | 1069 | 77,6 ± 9,9 | 48,4 ± 8,4 | 0,658 | 733 | 43,8 ± 14,4 | 33,7 ± 12,4 | 0,344 |
| Kern | 92 | 6,7 ± 4,6 | 18,3 ± 9,0 | 0,150 | 136 | 8,1 ± 6,9 | 17,3 ± 7,0 | 0,124 |
| Golgi | 40 | 2,9 ± 3,1 | 10,6 ± 6,2 | 0,112 | 547 | 32,7 ± 12,3 | 18,8 ± 5,8 | 0,456 |
| Distales Cytoplasma (RER+SG) | 160 | 11,6 ± 9,4 | 18,7 ± 8,9 | 0,225 | 235 | 14,0 ± 8,3 | 27,6 ± 12,6 | 0,135 |
| Mitochondrien Lysosomen | 16 | 1,2 ± 1,0 | 3,9 ± 1,1 | 0,122 | 23 | 1,4 | 2,6 | 0,140 |
| Ganze Zellen | 1377 (n=17) | 100 | 100 | 0,410 | 1674 (n=31) | 100 | 100 | 0,264 |
| Mittlere Zellfläche | $\bar{F}$ = 197,4 ± 78,5 (S.D.) $\mu m^2$ (n=17) | | | | $\bar{F}$ = 204,2 ± 72,4 (S.D.) $\mu m^2$ (n=31) | | | |
| Mittlere Anzahl SK / Zelle | $\bar{N}_{SK}$ = 81,0 ± 31,0 (S.D.) (n=17) | | | | $\bar{N}_{SK}$ = 54 ± 25 (S.D.) (n=31) | | | |

Tränendrüsen-Azini wurden isoliert, mit L-(4,5-$^3$H)-Leucin (500 $\mu$Ci/ml) 2min pulsmarkiert und unmittelbar danach (A) bzw. nach 30 min (B) fixiert, für die Autoradiographie wie unter 2.4.6. beschrieben präpariert (Expositionszeit 3 Tage) und ausgewertet.

Die Daten aus einem Experiment sind repräsentativ für 3 Experimente. Die Verteilungen der Silberkörner über den Kompartimenten sind mit $p < 0,05$ nicht zufällig. Der Background (=Anzahl der Silberkörner (SK) pro Flächeneinheit ($\mu m^2$) nichtmarkierter Schnittbereiche) betrug < 1SK/100 $\mu m^2$. S.D., Standardabweichung.

Tabelle VI: Verteilung von Silberkörnern in Tränendrüsen-Azinus-Zellen

| | C Pulse 2min +60min Chase | | | | D Pulse 2min + 120min Chase | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Silberkörner gesamt | Silberkörner % ± S.D. | Fläche % ± S.D. | Silberkörner pro $\mu m^2$ | Silberkörner gesamt | Silberkörner % ± S.D. | Fläche % ± S.D. | Silberkörner pro $\mu m^2$ |
| Basales Cytoplasma (RER) | 560 | 27,6 ± 11,7 | 34,0 ± 8,1 | 0,236 | 204 | 18,2 ± 10,8 | 29,9 ± 9,0 | 0,164 |
| Kern | 158 | 7,8 ± 5,1 | 18,1 ± 10,0 | 0,104 | 74 | 6,6 ± 6,9 | 15,7 ± 7,7 | 0,113 |
| Golgi | 927 | 45,7 ± 13,6 | 18,1 ± 6,8 | 0,610 | 173 | 15,4 ± 5,7 | 13,4 ± 5,6 | 0,311 |
| Distales Cytoplasma (RER+SG) | 369 | 18,2 ± 7,2 | 27,3 ± 10,3 | 0,161 | 659 | 58,8 ± 11,3 | 37,2 ± 12,7 | 0,426 |
| Mitochondrien Lysosomen | 14 | 0,7 | 2,5 | 0,067 | 11 | 1,0 | 3,8 | 0,070 |
| Ganze Zellen | 2028 (n=39) | 100 | 100 | 0,241 | 1121 (n=19) | 100 | 100 | 0,270 |
| Mittlere Zellfläche | $\bar{F}$ = 215,3 ± 64,0 (S.D.) $\mu m^2$ (n=39) | | | | $\bar{F}$ = 218,7 ± 55,2 (S.D.) $\mu m^2$ (n=19) | | | |
| Mittlere Anzahl SK / Zelle | $\bar{N}_{SK}$ = 52 ± 17 (S.D.) (n=39) | | | | $\bar{N}_{SK}$ = 59 ± 27 (S.D.) (n=19) | | | |

Tränendrüsen-Azini wurden isoliert, mit L-(4,5-$^3$H)-Leucin (500 $\mu$Ci/ml) 2 min pulsmarkiert und nach 60 min (C) bzw. nach 120 min (D) fixiert, für die Autoradiographie wie unter 2.4.6. beschrieben präpariert (Expositionszeit 3 Tage) und ausgewertet.
Die Daten aus einem Experiment sind repräsentativ für 3 Experimente. Die Verteilungen der Silberkörner über den Kompartimenten sind mit $p < 0,05$ nicht zufällig. Der Background (=Anzahl der Silberkörner (SK) pro Flächeneinheit ($\mu m^2$) nichtmarkierter Schnittbereiche) betrug < 1 SK / 100 $\mu m^2$. S.D., Standardabweichung.

Abb. 16 - 20: Elektronenmikroskopische Autoradiogramme von Azinus-Zellen fixiert zu verschiedenen Zeitpunkten nach Pulsmarkierung mit L-(4,5-$^{3}$H)-Leucin. Peroxidase-Reaktion.

Abb. 16: 0 min nach Pulsmarkierung. Die Radiomarkierung ist fast ausschließlich über dem RER lokalisiert. Bis auf die kondensierenden Vakuolen (Pfeile) ist der Golgi-Komplex (G) peroxidase-negativ.
Vergrößerung: 6000 x.

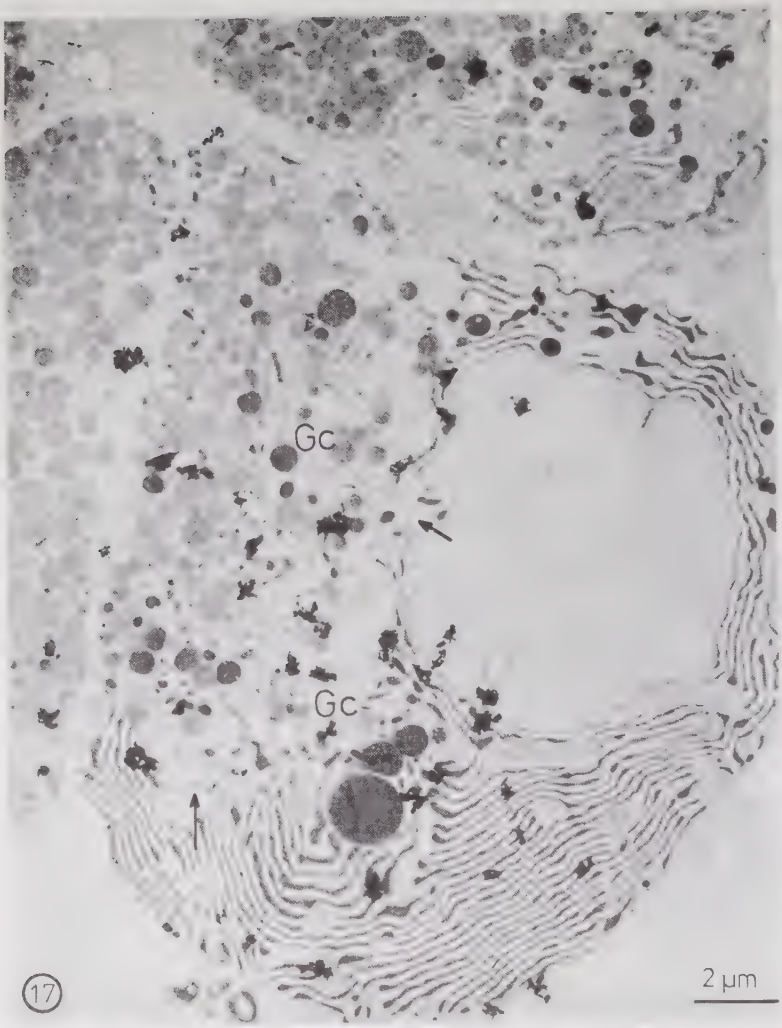



Abb. 17: 30 min nach Pulsmarkierung befinden sich die Silberkörner über dem RER-nahen Golgi-Bereich und teilweise über dem RER. Während die Golgi-Zisternen (Gc) Peroxidase-negativ sind, erscheinen vereinzelt Peroxidase-positive Golgi-Vesikel (Pfeile). Vergrößerung: 7500 x.

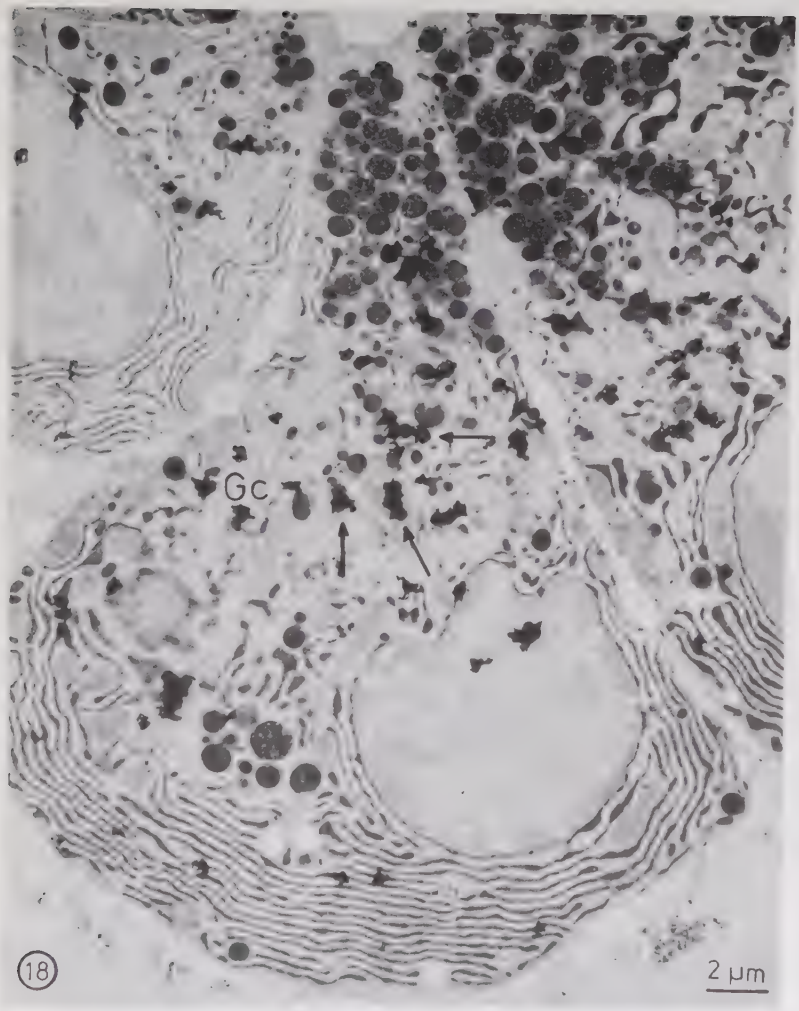



Abb. 18: Nach 60 min ist der Golgi-Bereich maximal markiert. Die Markierung des RER ist stark zurückgegangen. Vereinzelt befinden sich Silberkörner über Golgi-nahen Sekretgranula (Pfeile). Die Golgi-Zisternen (Gc) sind Peroxidase-negativ.
Vergrößerung: 6000 x.

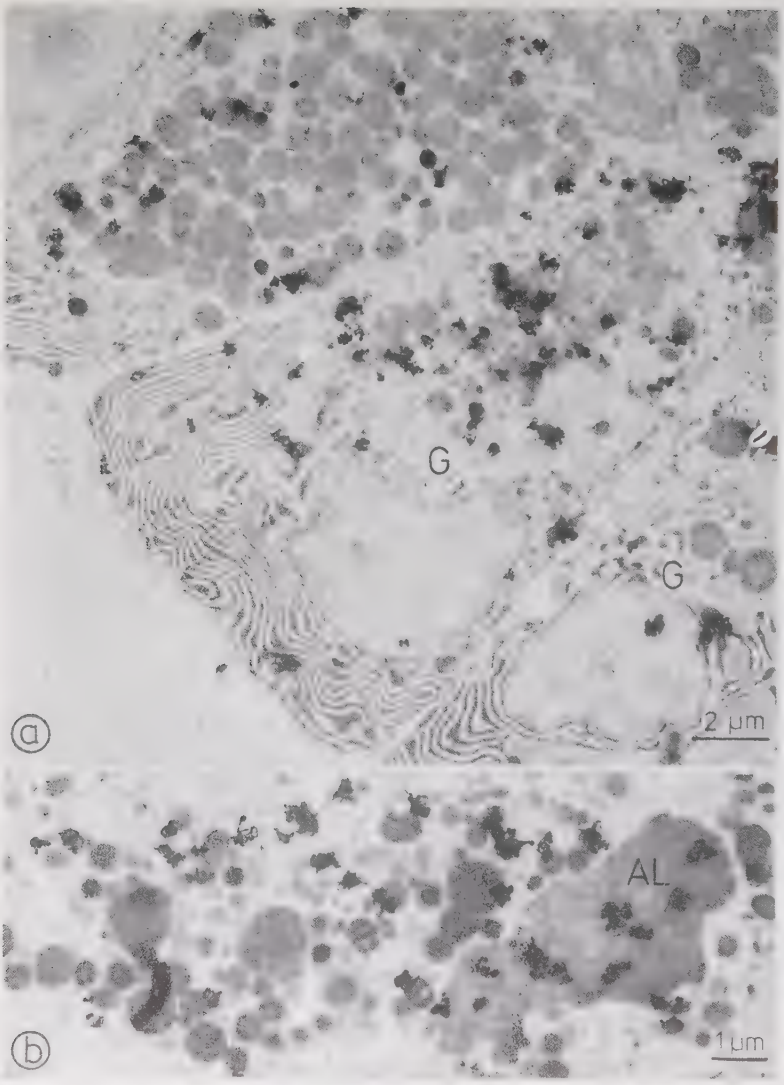



Abb. 19: Nach 120 min sind die Sekretgranula markiert (a); ein Teil der Markierung befindet sich bereits über dem Azinuslumen (b). Der Golgi-Komplex (G) ist Peroxidase-positiv. AL, Azinuslumen. Vergrößerungen: (a) 7000 x, (b) 10 000 x.

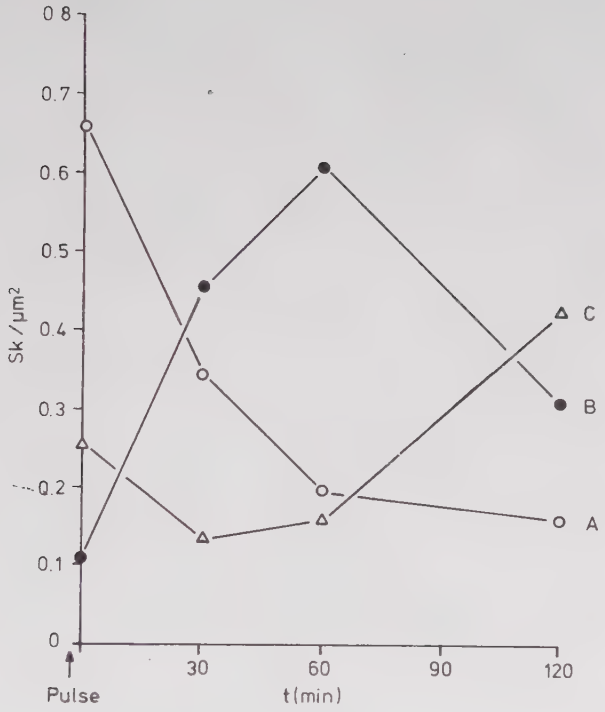



Abb. 20: Morphometrische Analyse elektronenmikroskopischer Autoradiogramme (vgl. Tab. VI). Die Silberkorndichte (SK/ $um^2$) nimmt über dem basalen Cytoplasma (A) rasch ab. Nach 60 min ist der Golgi-Komplex (B) maximal markiert. Nach 120 min hat die Pulswelle das apikale Cytoplasma (C) zum größten Teil erreicht, nur eine geringe Restmarkierung ist über dem basalen Cytoplasma verblieben.

Details des Transportes im Golgi-Komplex und den angrenzenden Kompartimenten (Abb. 21 a, b) sind in Tabelle VII dargestellt. Sie zeigt die prozentuale Silberkornverteilung:

Tabelle VII: Verteilung von Silberkörnern im Golgi-Komplex isolierter Tränendrüsen-Azini nach Pulsmarkierung (2 min) mit L-(4,5-$^{3}$H)-Leucin und einer Chase-Periode von 30 bzw. 60 min.

| | % Silberkörner 30 min (± S.D.) | % Silberkörner 60 min (± S.D.) |
|---|---|---|
| Golgi-nahes RER | 35 ± 14 | 7 |
| periphere Vesikel | 28 ± 11 | 38 ± 12 |
| Golgi-Zisternen | 30 ± 11 | 19 ± 6 |
| kondensierende Vakuolen | 7 | 36 ± 15 |

Die Isolierung der Azini, die autoradiographische Präparation und die quantitative Auswertung erfolgten wie bei Tab. VI beschrieben. Zu beachten ist die reziproke Zu- und Abnahme der Radiomarkierung über kondensierenden Vakuolen (60 min) bzw. RER (30 min) und außerdem die am Transport radiomarkierter Proteine beteiligten Golgi-Zisternen. S.D.: Standardabweichung.

Aus der Tabelle VII geht eine Abnahme der Silberkornzahl im Golgi-nahen RER und gleichzeitig eine Zunahme über den kondensierenden Vakuolen zwischen 30 und 60 min nach der Pulsmarkierung hervor. Außerdem ist ein leichter Anstieg der Silberkornzahl von 28% auf 38% über den peripheren Golgi-Vesikeln und eine Abnahme von 30% auf 19% über Golgi-Zisternen ersichtlich. Die Wanderung der Pulswelle vom RER zu kondensierenden Vakuolen dauert demnach etwa 30 min.

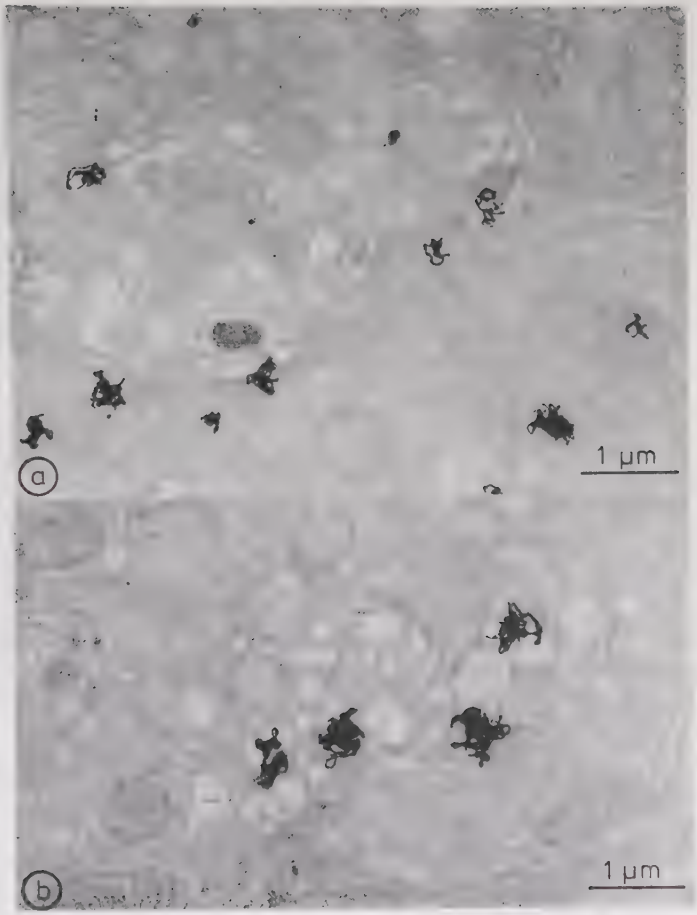



Abb. 21: Details des Transportes radiomarkierter sekretorischer Proteine im Golgi-Komplex.
(a) Nach 30 min befindet sich ein Großteil der Markierung über den Golgi-Zisternen und nach 60 min hauptsächlich über den kondensierenden Vakuolen (b).
Vergrößerungen: (a) 18 000 x, (b) 22 500 x.

Radiomarkierung nach Stimulation mit Carbachol

Licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen 10 min nach der Stimulation mit Carbachol eine Degranulierung der Zellen (Abb. 22 a, b). Nur wenige Silberkörner sind über den restlichen Sekretgranula und den erweiterten Lumina zu erkennen. Mit fortschreitender Stimulierung der Azini (60 min) verschwinden die Sekretgranula in einigen Zellen ganz und das Lumen reicht bis in die Nähe des Golgi-Komplexes (Abb. 14, 22). Die ursprüngliche Radiomarkierung geht auf eine geringe Restmarkierung der Zelle zurück (Abb. 22 c).

### 3.4.4. Vergleich verschiedener Entwicklungsmethoden in der Autoradiographie

Für die Entwicklung der Ilford L4-Emulsion wurden neben dem Kodak D 19b-Entwickler die physikalischen Entwickler Phenidon und Elon auf ihre Eignung für die quantitative Autoradiographie untersucht.

Entwicklung mit Phenidon

Um nach Entwicklung mit Phenidon eine Silberkorndichte zu erhalten, die mit der nach Entwicklung mit D 19b vergleichbar ist, müssen die Autoradiogramme erst mit Goldsalzen wie z.B. Goldchlorid vorbehandelt werden (Goldlatensifikation, s. 2.4.6.2.).

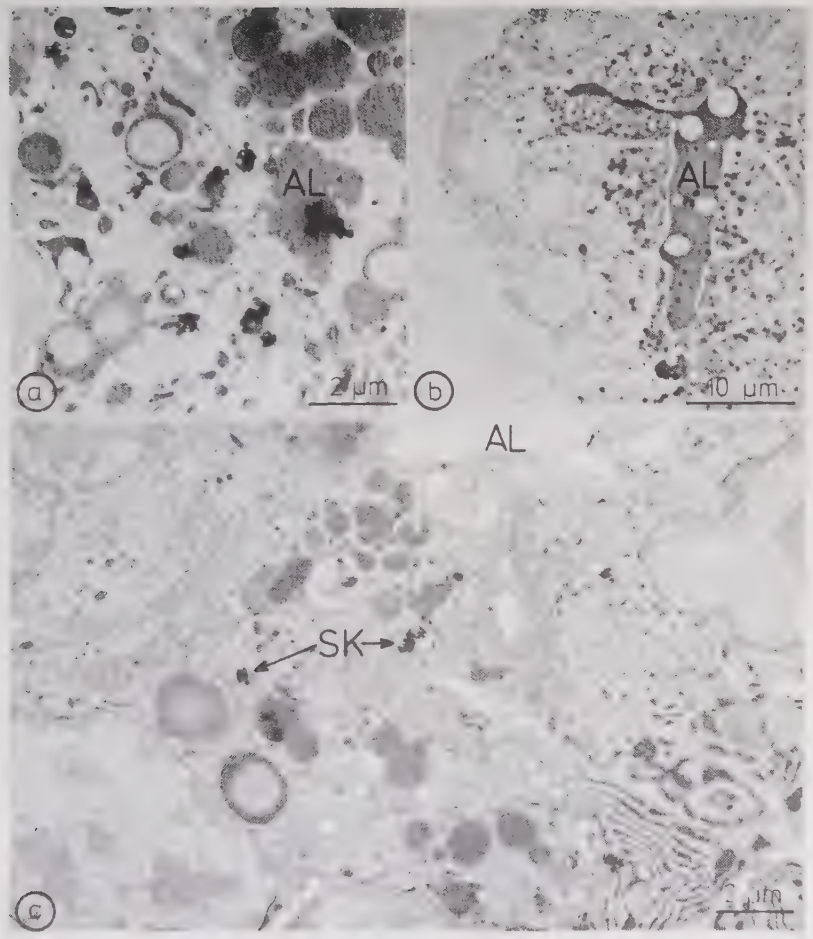



Abb. 22: Nach Stimulation mit Carbachol werden licht- (b) und elektronenmikroskopisch (a) exocytotische Lakunen an der apikalen Plasmamembran sichtbar. Die Markierung über den Sekretgranula nimmt proportional zur Degranulierung der Zelle ab. Das vergrößerte Lumen (AL) ist noch homogen mit DAB-Reaktionsprodukt angefüllt und schwach markiert. Nach 50 min Stimulation sind intrazellulär nur vereinzelt noch Silberkörner (Sk, Pfeile) sichtbar, die Degranulierung fast vollständig und das Lumen (AL) Peroxidase-negativ und unmarkiert (c). Schnittdicke von (b): 0,25 µm. Vergrößerungen: (a) 8000 x, (b) 1900 x, (c) 7000 x.

Die mit Phenidon entwickelten Autoradiogramme hatten folgende Nachteile:

1. Geringere Reproduzierbarkeit der Silberkorndichte.
2. Wesentlich höherer Background (Anzahl der Silberkörner pro Flächeneinheit nichtradiomarkierter Bereiche).
3. Höherer 'half-distance'(HD)-Wert von 160 nm im Vergleich zu 145 nm bei Entwicklung mit D 19b (der HD-Wert bezeichnet (Salpeter et al., 1969; Salpeter und Mc Henry, 1973) den Abstand von der radioaktiven Quelle, innerhalb dessen 50% aller Silberkörner liegen).
4. Schlechtere Färbbarkeit des Gewebes.

Die Entwicklung mit Phenidon ist daher für quantitative Autoradiographie weniger geeignet.

Entwicklung mit Elon

Um eine vergleichbare Silberkorndichte wie bei der Entwicklung mit D 19b zu erhalten, müssen die Autoradiogramme vor der Entwicklung mit Elon 10 mal länger exponiert und ebenfalls mit Goldchlorid (GAE-Entwicklung) vorbehandelt werden. Der Background ist etwas und der HD-Wert mit 90 nm bei weitem niedriger als nach der Entwicklung mit D 19b. Der bessere Kontrast der EM-Autoradiogramme und die kleinere Silberkorngröße lassen ein Arbeiten in höheren Auflösungsbereichen als mit D 19b zu. Allerdings kann die Zahl der Silberkörner von 1 bis 7, je nach Expositionszeit, Zeit und Temperatur der Goldlatensifikation und Entwicklung (pro radioaktiver Quelle) variieren. Dieser Nachteil läßt den GAE-Entwickler für die quantitative Autoradiographie weniger geeignet erscheinen. Für die qualitative Autoradiographie besitzt er jedoch gegenüber der Entwicklung mit Phenidon und D 19b bessere Voraussetzungen durch niedrigeren HD-Wert, niedrigeren Background, bessere Transparenz der entwickelten Fotoschicht und kleinere, punktförmige Silberkörner (Abb. 23).

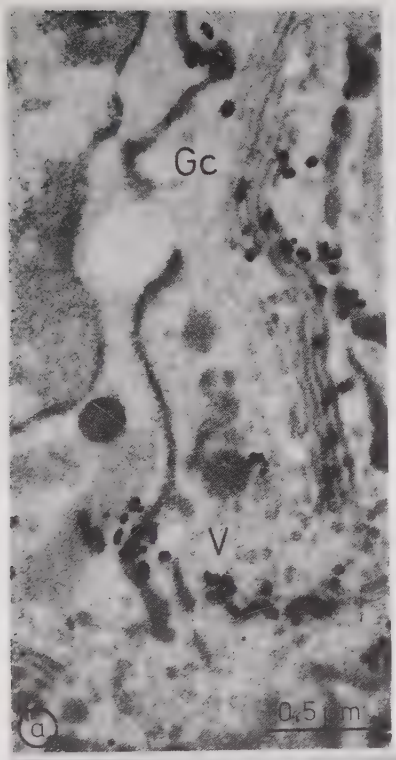
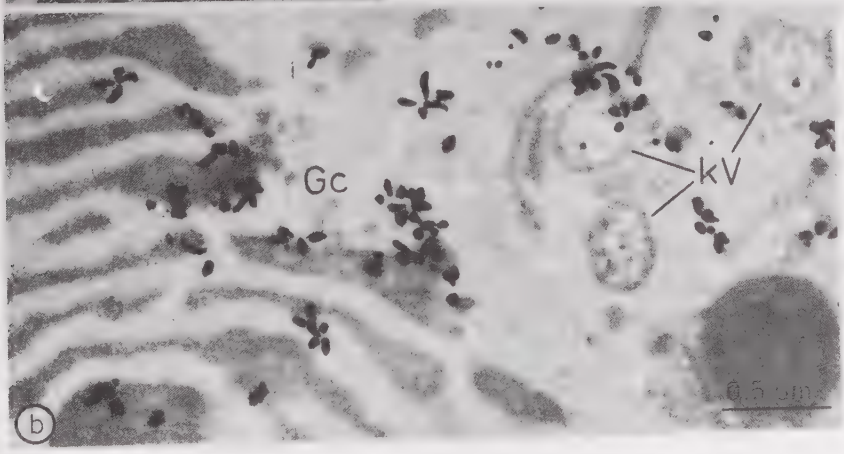



Abb. 23:

Ausschnitte aus einer Azinuszelle nach Entwicklung der Autoradiogramme mit GAE-Entwickler.
(a) Nach 60 min liegt ein Großteil der Silberkörner über Peroxidase-positiven Golgi-Zisternen (Gc) und -Vesikeln (V). Ein Teil der sekretorischen Proteine einschließlich der Peroxidase wird also über die Golgi-Zisternen zu den kondensierenden Vakuolen transportiert. Vergrößerung: 42 000 x.




(b) Nach 30 min liegen die Silberkörner über dem Golgi-nahen RER und zum Teil über den kondensierenden Vakuolen (kV). Die Golgi-Zisternen (Gc) sind Peroxidase-negativ. Man beachte, daß ein Teil der sekretorischen Proteine direkt zu den kondensierenden Vakuolen transportiert wird.
Vergrößerung: 42 000 x.

# 4. DISKUSSION

## Die Tränendrüse - ein geeignetes in vitro-System

Die Tränendrüse der Ratte sezerniert wie alle serösen Drüsen ein eiweißhaltiges, dünnflüssiges Sekret. Ein Bestandteil des Sekretes ist die Tränendrüsen-Peroxidase, die ein geeignetes Markerenzym für biochemische und cytochemische Untersuchungen über den sekretorischen Prozeß darstellt (Herzog und Miller, 1972; Herzog und Fahimi, 1973; Herzog et al., 1976; Herzog, 1979). Das Sekret wird nach cholinerger (Herzog et al., 1976; Putney et al., 1978), α-adrenerger (Keryer und Rossignol, 1976; Herman et al., 1978; Putney et al., 1978) oder ß-adrenerger Stimulation (Friedman et al., 1981) abgegeben. Da es keine meßbaren Lipase-, Phospholipase- oder Protease-Aktivitäten enthält, die eine zellschädigende Wirkung entfalten könnten (Meldolesi et al., 1971; Castle, 1973), ist die Tränendrüse für in vitro-Untersuchungen besonders geeignet. Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden intakte Azini aus dem Gewebeverband isoliert.

## Isolierte Azini in vitro

Gegenüber isolierten Lakrimocyten (Herzog et al., 1976) haben isolierte Azini folgende Vorzüge:

(1) In isolierten Azini bleibt die für die Sekretion wichtige Polarität der Drüsenendstückzellen erhalten. Diese Polarität ist unter anderem an die Funktion der 'tight junctions' gebunden, die die apikale von der basolateralen Plasmamembran trennen (Dragsten et al., 1981) und die Isolation unbeschadet überstehen.

(2) Isolierte Azini bleiben morphologisch und funktionell länger intakt als isolierte Zellen, da sie weniger Isolierungsartefakte aufweisen.

Für die hier beschriebenen Untersuchungen sind isolierte Azini den Drüsenläppchen vorzuziehen, da sie sich mit ihrem sehr viel kleineren Radius durch eine besonders kurze Diffusionsstrecke für Substanzen aus dem Kulturmedium auszeichnen. Dadurch ist zum Beispiel eine Verkürzung der Pulsmarkierung mit radiomarkierten Substanzen von 4 min bei Drüsenläppchen (Castle et al., 1972) auf weniger als 2 min bei isolierten Azini möglich.

Nachweis der Peroxidase als sekretorisches Protein

Die Anwesenheit von Peroxidase-positivem Reaktionsprodukt in den RER-Zisternen und anderen sekretorischen Kompartimenten weist die Peroxidase noch nicht als sekretorisches Protein aus (Herzog, 1979). Bei Schilddrüsen- und Kupffer-Zellen konnte ebenfalls Peroxidase-Reaktions-Produkt in den RER-Zisternen nachgewiesen werden: Die Schilddrüsen-Peroxidase ist jedoch kein sekretorisches, sondern ein integrales Membranprotein (Rawitch et al., 1979). Das gilt möglicherweise auch für die Peroxidase in Kupffer-Zellen (Fahimi, 1970).

Nach Carbachol-Stimulation wurde Tränendrüsen-Peroxidase im Lumen isolierter Azini cytochemisch und im umgebenden Medium colorimetrisch darstellbar. Ihre Löslichkeit wird unterstrichen durch ihre Nachweisbarkeit in der IEF-Gelelektrophorese ohne vorherige Behandlung mit Detergentien. Nach isoelektrischer Fokussierung erhält man 12 Peroxidase-positive Banden zwischen pH 4,6 und 6,8.

Die Möglichkeit, daß die Tränendrüsen-Peroxidase ein Membranprotein ist, scheidet mit hoher Wahrscheinlichkeit aus folgenden Gründen aus:

(1) Bei der Exocytose kommt es zu keinem Membranverlust ins Lumen (Palade, 1975). Im Sekret ist daher kein Exocytose-bedingtes Membranmaterial nachweisbar (Tanaka et al., 1980).
(2) Die ins Lumen freigesetzte Peroxidase ist cytochemisch immer homogen verteilt.
(3) Integrale Membran-Proteine wie die Schilddrüsen-Peroxidase (Rawitch et al., 1979) sind nur nach vollständiger Auflösung der Membran mit Detergentien in der Gelelektrophorese nachweisbar.

Sauerstoff-Verbrauchsmessung

Die Sauerstoff-Verbrauchsmessungen dienten als Vitalitätskriterium der isolierten Azini. Es wurde davon ausgegangen, daß die Stimulierbarkeit mit Carbachol und die Hemmung mit Atropin an die funktionelle Integrität der Drüsenzelle gebunden sind: zerstörten Zellen oder Gewebefraktionen fehlt dieses Vitalitätskriterium. Intakte Azini haben eine Ruherate von 0,43 nmol $O_2$ x ($\mu$g DNS)$^{-1}$ x min$^{-1}$, die durch Stimulation mit $10^{-4}$M Carbachol um 36% erhöht wird. Dieser Anstieg entspricht etwa dem bei Lakrimocyten (Herzog et al., 1976) und ist ein verläßlicher Indikator für die Integrität der Zellen.
Isolierte Azini der Parotis haben eine Ruherate von 1 nmol $O_2$ x ($\mu$g DNS)$^{-1}$ x min$^{-1}$ und eine Stimulationsrate des Sauerstoffverbrauchs nach $10^{-5}$M Carbachol von etwa 70% (Schmidt et al., 1980), während bei isolierten Schilddrüsen-Follikeln des Schweins eine Ruherate von 0,30 nmol $O_2$ ($\mu$g DNS)$^{-1}$ x min$^{-1}$ ermittelt wurde (Herzog, unver-

öffentlicht). Die Ruherate des Sauerstoff-Verbrauches scheint eine für jeden Zelltyp charakteristische Größe zu sein.
Im Gegensatz zu isolierten Azini der Parotis (Schmidt et al., 1980, 1981) konnte der $O_2$-Verbrauch in Azini der Tränendrüse mit Isoproterenol nicht stimuliert werden. Zwar gibt es keine Hinweise für die Stimulation des $O_2$-Verbrauches mit adrenergen Sekretagoga, jedoch konnten Herman et al. (1978) und Putney et al. (1978) eine Protein- bzw. Peroxidase-Sekretion $\alpha$-adrenerg stimulieren. Vor kurzem wurden Beobachtungen von Friedman et al. (1981) veröffentlicht, wonach Peroxidase auch nach $\beta$-adrenerger Stimulation mit Isoproterenol sezerniert wird.

## Nachweis der Kompartimentierung sekretorischer Proteine

Die gleichzeitige Anwendung der cytochemischen und autoradiographischen Techniken hat den Vorzug, die hohe räumliche Auflösung der Lokalisation des Reaktionsproduktes mit der Kinetik des Transportes zu verknüpfen, die sich aus der zeitabhängigen Verteilung der Silberkörner ergibt (siehe Tab. I).
Die cytochemische Lokalisierung der Peroxidase erlaubt eine genaue Darstellung der am sekretorischen Prozeß beteiligten Kompartimente. Bei den hier verwendeten erwachsenen Tieren war das Reaktionsprodukt immer auf den Zisternenraum des RER beschränkt und dort homogen verteilt, aber niemals im umgebenden Cytoplasma nachweisbar. Diese Kompartimentierung kann wegen der geringeren Auflösung autoradiographischer Methoden nicht ohne weiteres auf alle anderen sekretorischen Proteine übertragen werden. Aus immuncytochemischen Untersuchungen an verschiedenen Drüsenzellen wissen wir aber, daß

auch andere sekretorische Proteine ausschließlich auf den Innenraum membranbegrenzter Kompartimente beschränkt sind (Kraehenbuhl et al., 1977; Geuze et al., 1979). Die Annahme Rothman's (1975), daß sekretorische Proteine im Cytoplasma auch außerhalb membranbegrenzter Kompartimente vorkommen und über die Membran mit den kompartimentierten Proteinen im Gleichgewicht stehen, ist dieser Befunde wegen unwahrscheinlich.

Die unmittelbar nach der Pulsmarkierung über dem basalen Cytoplasma (hauptsächlich RER) autoradiographisch dargestellten sekretorischen Proteine werden im Verlauf des intrazellulären Transportes im Golgi-Komplex und, später, im apikalen Cytoplasma (hauptsächlich Sekretgranula) nachweisbar.

Die autoradiographische Methode gestattet nicht, auf die Kompartimentierung sekretorischer Proteine zu schließen. Sie erlaubt auch keine Rückschlüsse auf eine eventuelle inhomogene Verteilung der Proteine in sekretorischen Kompartimenten. Nur die hohe Auflösung der Peroxidase-Technik ermöglichte es, während der postnatalen Entwicklung der Ratte zu Beginn der Peroxidase-Synthese deren diskontinuierliche Verteilung in RER-Zisternen darzustellen: Bis zu 6 h nach der Geburt kommt das Reaktionsprodukt im RER nur in eng umschriebenen Segmenten vor, die mit Peroxidase-negativen Zisternen des RER kommunizieren (Herzog und Miller, 1972). Im Epithel der Uterusschleimhaut der Ratte (Brökelmann und Fawcett, 1969) und in frühen neutrophilen Promyelocyten von Kaninchen und Ratte (Ackermann und Clark, 1971) erschien die Peroxidase nach der Synthese ebenfalls nur in begrenzten Abschnitten des RER. Bei sich differenzierenden Plasmazellen von Kaninchen ist die Synthese von Antikörpern gegen Meerrettich-Peroxidase (HRP) nur in den perinukleären Zisternen sichtbar (Leduc et al., 1968). Immuncytochemische Untersuchungen über die inhomogene Ver-

teilung anderer sekretorischer Proteine fehlen zur Zeit noch.
Die Darstellung dieser Kompartimentierung ist mit cytochemischen Methoden möglich geworden, während der Transport sekretorischer Produkte von einem Kompartiment zum nächsten autoradiographisch nachweisbar ist. Die hier vorliegenden autoradiographischen Untersuchungen haben gezeigt, daß in den Endstückzellen der Tränendrüse der Ratte der Transport vom RER über den Golgi-Komplex zu den Sekretgranula 2 h dauert. Details dieses Transportes insbesondere im Golgi-Bereich werden im nächsten Kapitel diskutiert.

Intrazelluläre Lokalisation und Transport sekretorischer Proteine

Die autoradiographischen Untersuchungen zeigen, daß die sekretorischen Proteine der Glandula lacrimalis einem intrazellulären Transportweg folgen, der in großen Zügen dem des exokrinen Pankreas (Caro und Palade, 1964; Jamieson und Palade, 1967 a, b) und der Parotis (Castle et al., 1972) gleicht, aber in zahlreichen Details von diesem abweicht. Bei der Tränendrüse findet die Neusynthese von Proteinen überwiegend im RER des basalen Teils der Endstückzellen statt; denn dort befinden sich unmittelbar nach der Pulsmarkierung etwa 78% der Silberkörner. Vergleichbare Werte wurden im exokrinen Pankreas und in der Parotis beschrieben (Tab. VIII). Aus Tabelle VIII geht außerdem hervor, daß der intrazelluläre Transport neusynthetisierter Proteine im Bereich des Golgi-Komplexes vom RER zu den kondensierenden Vakuolen beim exokrinen Pankreas und der Parotis etwa 30 min schneller ist als bei der Lacrimalis. Bei ihr werden die kondensierenden Vakuolen erst nach 60 min maximal markiert (Tab.VII).

Tabelle VIII:

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse des elektronenmikroskopisch-autoradiographisch untersuchten intrazellulären Transportes sekretorischer Proteine der Tränendrüse der Ratte (vgl. Tab. VI, VII), des Meerschweinchen-Pankreas und der Kaninchen-Parotis. Zu Beginn der Chase-Periode nach Pulsmarkierung mit L-(4,5-$^{3}$H)-Leucin befinden sich bei allen 3 Drüsen etwa gleich hohe prozentuale Silberkornverteilungen über dem RER. Beim Pankreas nimmt die Aktivität über dem RER bereits 17 min nach Pulsmarkierung fast auf den Minimalwert (117 min nach Pulsmarkierung) ab. Nach 37 min sind die kondensierenden Vakuolen maximal markiert, und der Proteintransport vom RER zu den Zymogengranula dauert knapp 2 h. Bei der Parotis sinkt die Aktivität über dem RER 36 min nach Pulsmarkierung etwa auf das Minimum (356 min nach Pulsmarkierung) ab. Nach 36 min sind die kondensierenden Vakuolen und die Golgi-Zisternen auf der trans-Seite maximal markiert. Der Proteintransport vom RER zu den reifen Granula dauert 175-355 min. Bei der Lacrimalis nimmt die Aktivität über dem RER wesentlich langsamer ab als beim Pankreas und der Parotis und sinkt erst nach 60 min auf den Minimalwert ab. Der Golgi-Komplex einschließlich der kondensierenden Vakuolen (vgl. Tab. VII) ist erst nach 60 min maximal markiert. Der Proteintransport vom RER zu den Sekretgranula dauert wie beim Pankreas etwa 2 h. Bei allen 3 Drüsen befindet sich nach Beendigung des Transportes sekretorischer Proteine eine etwa gleich hohe Restmarkierung von 20% über dem RER. Diese Markierung betrifft wahrscheinlich Proteine, die für den (intra-)zellulären Gebrauch bestimmt sind (siehe Diskussion). Zu beachten sind die verschiedenen Transportwege sekretorischer Proteine im Golgi-Komplex beim Pankreas, der Lacrimalis und Parotis und außerdem die extrem lange Konzentrierung und Verpackung sekretorischer Proteine (über unreife zu reifen Granula) bei der Parotis.

Tabelle VIII: Vergleich der Kinetiken des intrazellulären Transportes sekretorischer Proteine der Tränendrüse der Ratte, des Meerschweinchen-Pankreas[+] und der Kaninchen-Parotis[++]. Prozentuale Silberkornverteilung nach Pulsmarkierung mit L-(4,5-$^3$H)-Leucin und anschließender Chase-Periode.

| Drüsen / Zell-kompartimente | Lacrimalis % Silberkörner | | | | Pankreas % Silberkörner | | | | | | Parotis % Silberkörner | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 30 | 60 | 120 | 3 | 7 | 17 | 37 | 57 | 117 | 1 | 26 | 36 | (86) | 116 | (176) | (236) | 356 |
| | min nach Pulsmarkierung | | | | min nach Pulsmarkierung | | | | | | min nach Pulsmarkierung | | | | | | | |
| RER | 77,6 | 43,8 | 27,6 | 18,2 | 86,3 | 43,7 | 24,3 | | | 20,0 | 77,7 | 31,8 | 24,4 | | | | | 19,1 |
| Golgi-Komplex | | 32,7 | 45,7 | | | | | | | | | | | | | | | |
| periphere Vesikel, cis-Zisternen, trans-Zisternen, kondens. Vakuolen | siehe Tab. VII | | | | 43,0 | 37,5 | | | | | 27,4 | 22,0 | | | | | | 3,1 |
| | | | | | | | 19,5 | 48,5 | 35,8 | 7,5 | | | 40,3 | | | | | |
| Sekretgranula unreif | | | | | | | | | | | | | | (40,4) | 49,4 | | | |
| reif | | | | 58,8 | | | | | | 58,6 | | | | | | (35,2) | (49,5) | 58,5 |

[+] Jamieson et al., 1967 b [++] Castle et al., 1972

Während bei der Lacrimalis und der Parotis alle Golgi-Elemente am Proteintransport beteiligt sind, werden beim Meerschweinchen-Pankreas die Proteine direkt zu den kondensierenden Vakuolen unter Umgehung der Golgi-Zisternen transportiert (Jamieson und Palade, 1967 a). Diese Beobachtungen am Pankreas des Meerschweinchens weichen offenbar von denen an der Bauchspeicheldrüse des Rindes ab (Kraehenbuhl et al., 1977), bei der alle sekretorischen Proteine in Golgi-Zisternen immuncytochemisch nachweisbar waren. Daraus folgt, daß Details dieses Transportes im Golgi-Komplex in verschiedenen exokrinen Drüsenzellen erheblich voneinander abweichen und gleiche Drüsen verschiedener Tierspezies unterschiedliche Transportwege aufweisen können. Bei der Tränendrüse können radiomarkierte Proteine sowohl durch die Golgi-Zisternen als auch unter Umgehung der Golgi-Zisternen direkt zu den kondensierenden Vakuolen transportiert werden (Tab. VII). Mit hoher Wahrscheinlichkeit kann bei den vorliegenden Ergebnissen ausgeschlossen werden, daß die Golgi-Zisternen vollständig umgangen werden und sekretorische Proteine ausschließlich über den peripheren Golgi-Bereich direkt zu den kondensierenden Vakuolen transportiert werden. Aus Tabelle VII geht hervor, daß die Golgi-Zisternen 30 min nach Pulsmarkierung zu etwa 30% und nach 60 min zu etwa 19% am Transport der radiomarkierten sekretorischen Proteine beteiligt sind. Die autoradiographischen Ergebnisse werden durch die cytochemische Darstellung der Tränendrüsen-Peroxidase unterstützt: Die Golgi-Zisternen etwa der Hälfte aller Tränendrüsenendstückzellen enthalten Reaktionsprodukt der Peroxidase; dort ist es jedoch stets in geringerer Konzentration als im RER und den kondensierenden Vakuolen vorhanden. Daraus kann geschlossen werden, daß die Peroxidase nur zum Teil durch die Golgi-Zisternen und zu einem größeren Teil direkt zu den kondensierenden Vakuolen transportiert wird.

Die Details dieses Transportes sind noch ungenügend bekannt. Aus den elektronenmikroskopisch-cytochemischen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß der Transport wie im exokrinen Pankreas (Jamieson und Palade, 1967 a, b) diskontinuierlich erfolgt durch die Bildung von Transport- oder peripheren Golgi-Vesikeln. Diese scheinen sich von den 'transitional elements' zu lösen und teilweise die Tränendrüsen-Peroxidase zu kondensierenden Vakuolen, zu einem anderen Teil zu der Zisterne auf der cis-Seite des Golgi-Membran-Stapels zu transportieren. Es ist jedoch unbekannt, wie sekretorische Proteine von der cis- zur trans-Seite des Golgi-Komplexes weitergegeben werden. Wenn Peroxidase in Golgi-Zisternen nachweisbar ist, wird häufig ein Gradient zunehmender Dichte des Reaktionsproduktes der Peroxidase von der cis- zur trans-Seite beobachtet (siehe auch: Ackerman, 1971; Herzog und Miller, 1970, 1972; Miller und Herzog, 1969). Dieser Gradient könnte durch zunehmende Konzentrierung der Peroxidase zustandekommen oder durch Zunahme der Peroxidase-Aktivität infolge einer Modifizierung des Enzyms im Golgi-Komplex begründet sein. Es konnte eine Reihe anionischer Isoenzyme der Peroxidase in der Tränendrüse nachgewiesen werden (s. IEF-Gel-Elektrophorese), die möglicherweise durch unterschiedliche Modifikation im Golgi-Komplex zustande kommen.

Die Möglichkeit, daß sekretorische Proteine nacheinander die Zisternen von der cis- zur trans-Seite durchlaufen, folgt aus den Untersuchungen von Bergeron et al. (1978): In Golgi-Fraktionen der Rattenleber erscheinen neusynthetisierte Proteine zuerst in der GF3-Subfraktion (cis-Golgi-Zisternen) und 7 min später in der GF1-Subfraktion (trans-Golgi-Zisternen). Bei der Tränendrüse stehen keine vergleichbaren Fraktionierungsstudien zur Verfügung. Die autoradiographischen Ergebnisse zeigen jedoch, daß der Gipfelpunkt der Radioaktivität innerhalb 30 min vom

Golgi-nahen RER zu den kondensierenden Vakuolen, ein Teil der Radioaktivität jedoch durch die Golgi-Zisternen wandert (Tab. VII). Der Transport durch die Golgi-Zisternen in Tränendrüsenzellen beansprucht daher wesentlich mehr Zeit als in Hepatocyten.
Die verschiedenen Transportwege durch den Golgi-Komplex werden möglicherweise bereits vor Erreichen von Golgi-Zisternen und kondensierenden Vakuolen festgelegt. Dieser als 'sorting out' bezeichnete Vorgang findet möglicherweise in den 'transitional elements' des RER statt. Ein 'sorting out' von lysosomalen und exportablen Proteinen in diesem Bereich wurde von Sly und Stahl (1978) postuliert.
Bei Parotis und Pankreas hat die Hauptmasse der neusynthetisierten Proteine die Vakuolen bereits nach etwa 36 min erreicht (Tab. VIII). Bei der Tränendrüse dagegen erreicht erst nach 60 min ein geringer Teil der Proteine die kondensierenden Vakuolen, wogegen sich noch ein größerer Teil in den peripheren Golgi-Vesikeln und -Zisternen befindet. Bei der Lacrimalis verzögert sich der Proteintransport infolge langsamerer Ausschleusung aus dem RER und längerem Aufenthalt in Golgi-Zisternen und Golgi-Vesikeln. Die Ursache für den vergleichsweise langsamen Transport in der Tränendrüse ist unbekannt.

Auf der trans-Seite des Golgi-Komplexes, üblicherweise in einiger Entfernung von seinen Zisternen, wurde gelegentlich eine englumige Zisterne beobachtet, die in anderen Zellen (Novikoff, 1976) und in der Tränendrüse (Hand und Oliver, 1977) als 'rigid lamella' beschrieben wurde. Diese 'rigid lamella' wird von Novikoff (1971) als ein Teil des endoplasmatischen Retikulums angesehen, der eine eigenständige, vom Golgi-Apparat getrennte Organelle darstellt und der Verpackung lysosomaler Enzyme dient. Novikoff nennt diesen Teil GERL (Acronym aus Golgi, Endoplasmatisches Retikulum, Lysosomen). Auch

an der Tränendrüse ist GERL beschrieben worden (Hand und Oliver, 1977 a, b); dort soll er an der Biogenese kondensierender Vakuolen beteiligt sein. Da diese 'rigid lamella' in der Tränendrüse nur selten auftritt und deshalb autoradiographische Untersuchungen zu ihrer Funktion fehlen, kann über ihre Rolle zum Transport sekretorischer Proteine hier nichts ausgesagt werden. Die Beziehung des GERL zum sekretorischen Prozeß in der Tränendrüse ist deshalb ungeklärt. Die möglichen biogenetischen Beziehungen des GERL zu den Golgi-Zisternen sind Gegenstand cytochemischer Untersuchungen über die Lokalisation der sauren Phosphatase und der Thiaminpyrophosphatase. Diese haben bisher gezeigt, daß die Organellen des GERL ('rigid lamella' und kondensierende Vakuolen) und die Zisternen des Golgi-Komplexes nicht als separate Organellen betrachtet werden können (Pavelka und Ellinger, 1982) und möglicherweise biogenetisch in enger Beziehung zueinander stehen.

Speicherung exportabler Proteine in Sekretgranula und Abgabe in das Lumen durch Exocytose

Die Speicherung sekretorischer Proteine in Sekretgranula ist in zahlreichen sekretorischen Zellsystemen untersucht und dokumentiert worden (Palade, 1975). In der Tränendrüse der Ratte werden die Sekretgranula von der Welle radiomarkierter Proteine 2 h nach der Pulsmarkierung erreicht. Zu diesem Zeitpunkt liegen die Silberkörner über den Sekretgranula statistisch verteilt. Eine bevorzugte Markierung zuerst der Golgi-nahen und später der Lumen-nahen Sekretgranula wurde nicht beobachtet. In der Glandula parotis der Ratte wurde jedoch beschrieben, daß zwischen neuen (radiomarkierten) und alten (unmarkierten) Sekretgranula keine spontane Mischung stattfindet. Die

statistische Verteilung, wie sie bei der Tränendrüse beobachtet wird, erfolgt in der Parotis erst nach ß-adrenerger Stimulation (Sharoni et al., 1976).

Wenn die Pulswelle die Sekretgranula erreicht hat, sind noch etwa 20% der Radiomarkierung über dem basalen Cytoplasma der Azinus-Zelle zu beobachten. Daraus folgt, daß etwa 20% der Radiomarkierung in Proteine inkorporiert werden, die nicht exportabel sind. Vergleichbare Werte wurden am exokrinen Pankreas (Jamieson und Palade, 1967 b), an der Parotis (Castle et al., 1972; Sharoni et al., 1976) und etwas höhere Werte ( ~30% Markierung über dem Cytoplasma) in mammotrophen Zellen der Adeno-Hypophyse (Salpeter und Farquhar, 1981) beschrieben.
Die in den Sekretgranula gespeicherten sekretorischen Proteine werden auf dem Wege der Exocytose an das Azinus-Lumen abgegeben. Bei der Exocytose fusionieren die Membranen der Sekretgranula und der apikalen Zelloberfläche und rupturieren am Punkte der Fusion (Palade, 1975). Dadurch wird die Membran der Sekretgranula vorübergehend Bestandteil der apikalen Plasmamembran und die sekretorischen Proteine ein Teil des luminalen Inhaltes. Dieser Vorgang wird in der Tränendrüse durch cholinerge Stimulation ausgelöst, wobei die Exocytose von Peroxidase cytochemisch und die Exocytose radiomarkierter Proteine autoradiographisch dargestellt werden können. Auch nicht-stimulierte Azini zeigen bereits Exocytose. Die cholinerg induzierte Sekretion und in geringem Umfang auch die Ruhesekretion werden durch Atropin, einem Antagonisten der muscarinartigen Acetylcholin-Wirkung, gehemmt. Stimulation mit Isoproterenol (eigene Versuche) führte zu keiner sicher nachweisbaren Steigerung der Ruhesekretion. Allerdings wurde vor kurzem die Stimulierbarkeit der Peroxidase-Sekretion und damit die Möglichkeit des Vorhandenseins von ß-Rezeptoren in der Tränendrüse postuliert (Friedman et al., 1981).

Schematische Darstellung des sekretorischen Prozesses in der Tränendrüse der Ratte

Die vorliegenden autoradiographischen und cytochemischen Untersuchungen gestatten eine detaillierte Darstellung der Kinetik des intrazellulären Transportes und der am Transport beteiligten Kompartimente (Abb. 24):

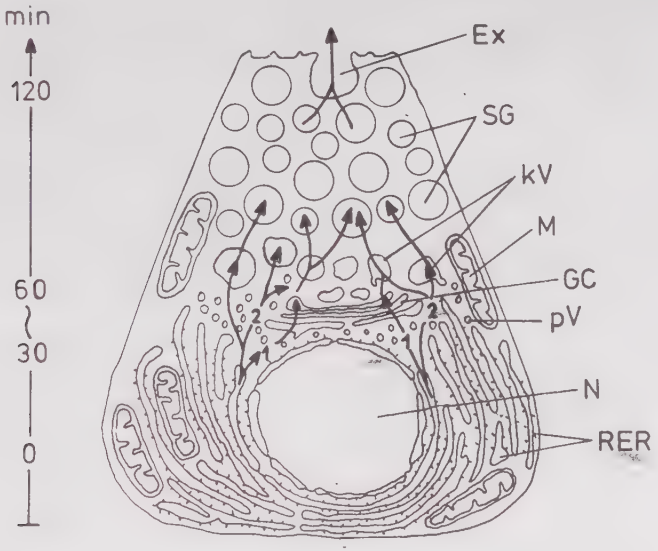



Abb. 24: Sekretorische Proteine werden in 2 h vom RER über den Golgi-Komplex (Golgi-Zisternen (GC), periphere Vesikel (pV) und kondensierende Vakuolen (kV)) zu Sekretgranula (SG) transportiert und nach cholinerger Stimulation durch Exocytose (Ex) in das Lumen freigesetzt.
Im Bereich des Golgi-Komplexes werden 2 verschiedene Wege eingeschlagen:
(1) 20-30% der sekretorischen Proteine werden durch die Golgi-Zisternen transportiert, bevor sie nach 60 min die kondensierenden Vakuolen erreichen.
(2) Der größere Teil gelangt unter Umgehung der Zisternen direkt zu den kondensierenden Vakuolen. Auf diesem Wege werden bereits nach 30 min neusynthetisierte Proteine in den kondensierenden Vakuolen beobachtet.
Der Transport durch die Golgi-Zisternen verzögert dagegen die Ankunft exportabler Proteine in kondensierenden Vakuolen. M, Mitochondrien; N, Nucleus.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Aus der Glandula lacrimalis der Ratte wurden Azini isoliert, die die kleinste Arbeitseinheit der Drüse darstellen, bei der die Zellen durch 'tight junctions' verbunden sind und längere Zeit ihre strukturelle und funktionelle Polarität behalten. Ihre Vitalität wurde durch Sauerstoffverbrauchsmessungen nachgewiesen.
In autoradiographischen Untersuchungen wurden isolierte Azini mit L-(4,5-$^{3}$H)-Leucin pulsmarkiert und zu verschiedenen Zeitpunkten danach fixiert. Die lichtmikroskopische Autoradiographie ergab eine zeitabhängige Verteilung der Silberkörner, deren Zuordnung zu membranbegrenzten Kompartimenten die elektronenmikroskopische Autoradiographie ermöglichte. Diese Verteilung erlaubte eine Analyse der Kinetik des intrazellulären Transportes sekretorischer Proteine und folgende Interpretationen (Abb. 24):

(1) Der Transport radiomarkierter Proteine vom rauhen endoplasmatischen Retikulum (RER) über den Golgi-Komplex zu den Sekretgranula dauert etwa 2 Stunden.
(2) Im Golgi-Bereich werden radiomarkierte Proteine unter Umgehung der Golgi-Zisternen (in ~30 min) direkt und, in einem 2. Weg, auch durch die Golgi-Zisternen (in ~ 60 min) zu den kondensierenden Vakuolen transportiert.
(3) Durch Carbachol-Stimulation wird eine Degranulierung mit gleichzeitiger Abnahme der Radiomarkierung induziert.

Wegen ihrer begrenzten räumlichen Auflösung wurden die autoradiographischen Untersuchungsmethoden mit der cytochemischen Darstellung der Tränendrüsen-Peroxidase, einem sekretorischen Protein, kombiniert. Die sekretorische Natur der Tränendrüsen-Peroxidase folgt aus ihrer Löslichkeit und Darstellbarkeit in der SDS-Gel-Elektrophorese,

in der 12 Isoenzyme vorwiegend im anionischen Bereich zwischen pH 4,6 und 6,8 in Erscheinung treten.

Die cytochemischen Untersuchungen ergaben:

(1) Die Peroxidase ist in allen sekretorischen Kompartimenten (RER, Golgi-Komplex und Sekretgranula) durch eine Membran vom Cytoplasma getrennt.

(2) In den Golgi-Zisternen ist die Peroxidase-Reaktion geringer als in den Zisternen des RER oder den kondensierenden Vakuolen. Daraus folgt, daß die Golgi-Zisternen am Transport von Peroxidase nur partiell beteiligt sind und möglicherweise zum Teil umgangen werden. Da die Peroxidase-Reaktion in den Zisternen auf der trans-Seite stärker ist, findet die Konzentrierung der Peroxidase wahrscheinlich bereits in den Golgi-Zisternen statt.

(3) Sekretorische Peroxidase wird durch Exocytose in das Azinus-Lumen freigesetzt.

Eine alternative Hypothese besagt, daß der intrazelluläre Transport und die Freisetzung sekretorischer Proteine mit Hilfe bidirektionaler Bewegung durch die Membranen der Sekretgranula in das Cytosol und von dort durch die apikale Plasmamembran in das Azinuslumen erfolgt (Rothman, S.S. (1975) 190, 747-753). Für den Transport sekretorischer Proteine in der Tränendrüse der Ratte kann dieser Mechanismus zumindest für die Peroxidase ausgeschlossen werden, weil sie stets in membranumgrenzten Kompartimenten gefunden wird.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

Ackerman, G.A., Clark, M.A.: Ultrastructural localization of peroxidase activity in normal human bone marrow cells. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 117, 463-476 (1971).

Baquiche, M.: Le dimorphisme sexuel de la glande de Loewenthal chez le rat albinos. Acta anat. (Basel) 36, 247-280 (1959).

Belding, M.E., Klebanoff, S.J., Ray, C.G.: Peroxidase-mediated virucidal systems. Science 167, 195-196 (1970).

Bergeron, J.J.M., Borts, D., Cruz, J.: Passage of serum-destined proteins through the Golgi apparatus of rat liver. An examination of heavy and light Golgi fractions. J. Cell Biol. 76, 87-97 (1978).

Bogart, B.I.: Electron microscopic autoradiographic analysis of the uptake and intracellular transport of $^{3}$H-leucine by the rat submandibular gland acinar cells in tissue slices. Anat. Rec. 187, 367-382 (1977).

Botelho, S.Y., Dartt, D.A.: Effect of calcium antagonism or chelation on rabbit lacrimal gland secretion and membrane potentials. J. Physiol. 304, 397-403 (1980).

Brökelman, J., Fawcett, D.W.: The localization of endogenous peroxidase in the rat uterus and its induction by estradiol. Biol. Reprod. 1, 59-71 (1969).

Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. 62, 315-322 (1956).

Caro, G.L., Palade, G.E.: Protein synthesis, storage, and discharge in the pancreatic exocrine cell. J. Cell Biol. 20, 473-495 (1964).

Castle, J.D., Jamieson, J.D., Palade, G.E.: Radioautographic analysis of the secretory process in the parotid acinar cell of the rabbit. J. Cell Biol. 53, 290-311 (1972).

Castle, J.D.: Studies on the secretory process of the rabbit parotid. Ph.D. thesis. The Rockefeller University, New York (1973).

Chance, B.: The nature of electron transfer and energy-coupling reactions. FEBS Lett. 23, 3-19 (1972).

Douglas, W.W.: Stimulus-secretion coupling: The concepts and dues from chromaffin and other cells. Br. J. Pharm. 34, 451-459 (1968).

Dragsten, P.R., Blumenthal, R., Handler, J.S.: Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? Nature 294, 718-722 (1981).

Eagle, H.: Amino acid metabolism in mammalian cell culture. Science 130, 432-437 (1959).

Essner, E.: Localization of endogenous peroxidase in rat lacrimal gland. J. Histochem. Cytochem. 19, 4, 216-225 (1971).

Fahimi, H.D.: The fine structural localization of endogenous peroxidase activity in Kupffer cells of the rat. J. Cell Biol. 47, 247-262 (1970).

Fahimi, H.D., Herzog, V.: A colorimetric method for measurement of the (peroxidase-mediated) oxidation of 3,3'-diaminobenzidine. J. Histochem. Cytochem. 21, 5, 499-503 (1973).

Farquhar, M.G., Palade, G.E.: Cell junctions in amphibian skin. J. Cell Biol. 26, 263-291 (1965).

Frasca, J., Parks, V.: A routine technique for double-staining ultrathin sections using uranyl and lead salts. J. Cell Biol. 25, 157-160 (1965).

Friedman, Z.Y., Lowe, M., Selinger, Z.: ß-Adrenergic receptor stimulated peroxidase secretion from rat lacrimal gland. Biochim. Biophys. Acta 675, 40-45 (1981).

Futaesaku, Y., Mizuhira, V., Nakamura, H.: A new fixation method using tannic acid for electron microscopy and some observations of biological specimens. Proc. Int. Congr. Histochem. Cytochem. 4, 155-164 (1972).

Gabe, M.: Conditionnement hormonal de la morphologie des glandes sousparotidiennes chez le rat albinos. C.R. Soc. Biol. (Paris) 149, 223-225 (1955).

Garrett, J.R., Emmelin, N.: Activities of salivary myoepithel cells: a review. Medical Biol. 57, 1-28 (1979).

Geuze, J.J., Slot, J.W., Tokuyasu, K.T.: Immunocytochemical localization of amylase and chymotrypsinogen in the exocrine pancreatic cell with special attention to the Golgi complex. J. Cell Biol. 82, 697-707 (1979).

Ginsel, L.A., Onderwater, J.J.M., Daems, W.Th.: Resolution of a gold latensification-elon ascorbic acid developer for Ilford L4 emulsion. Histochemistry 61, 343-346 (1979).

Graham, R.C., Karnovsky, M.J.: The early stages of injected horse-radish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney. Ultrastructural cytochemistry by a new technique. J. Histochem. Cytochem. 14, 291-302 (1966).

Greene, E.Ch.: In: "Anatomy of the Rat". Philadelphia. (The American Philosophical Society, ed.) Hafner Publ. Comp. New York/London. Vol. XXVII, S. 95 (1963).

Hand, A.R., Oliver, C.: Relationship between the Golgi apparatus, GERL, and secretory granules in acinar cells of the exorbital lacrimal gland. J. Cell Biol. 74, 399-413 (1977 a).

Hand, A.R., Oliver, C.: Cytochemical studies of GERL and its role in secretory granule formation in exocrine cells. Histochem. J. 9, 375-392 (1977 b).

Hanker, J.S., Yates, P.E., Metz, C.B., Rustioni, A.: A new specific, sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. Histochem. J. 9, 789-792 (1977).

Herman, G., Busson, S., Ovtracht, L., Maurs, C., Rossignol, B.: Regulation of protein discharge in two exocrine glands: rat parotid and exorbital lacrimal glands. Biol. Cellulaire 31, 3, 255-264 (1978).

Herzog, V., Miller, F.: Die Lokalisation endogener Peroxidase in der Glandula parotis der Ratte. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 107, 403-420 (1970).

Herzog, V., Miller, F.: The localization of endogenous peroxidase in the lacrimal gland of the rat during postnatal development. J. Cell Biol. 53, 3, 662-680 (1972).

Herzog, V., Fahimi, H.D.: A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3,3'-diaminobenzidine as hydrogen donor. Analyt. Biochem. 55, 554-562 (1973).

Herzog, V., Fahimi, H.D.: Intracellular distinction between peroxidase and catalase in exocrine cells of rat lacrimal gland: a biochemical and cytochemical study. Histochem. 46, 273-286 (1976).

Herzog, V., Sies, H., Miller, F.: Exocytosis in secretory cells of rat lacrimal gland. J. Cell Biol. 70, 692-706 (1976).

Herzog, V., Farquhar, M.G.: Luminal membrane retrieved after exocytosis reaches most Golgi cisternae in secretory cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 11, 5073-5077 (1977).

Herzog, V.: The secretory process as studied by the localisation of endogenous peroxidase. J. Histochem. Cytochem. 27, 10, 1360-1362 (1979).

Iwatsuki, N., Petersen, O.H.: Intracellular $Ca^{2+}$ injection causes membrane hyperpolarization and conductance increase in lacrimal acinar cells. Pflügers Arch. 377, 185-187 (1978).

Jahn, R., Söling, H.D.: Protein phosphorylation during secretion in the rat lacrimal gland. FEBS Letters 131, 1, 28-30 (1981).

James, T.H.: The site of reaction in direct photographic development. J. Colloid Sci. 3, 447-455 (1948).

Jamieson, J.D., Palade, G.E.: Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. I. Role of the peripheral elements of the Golgi complex. J. Cell Biol. 34, 577-596 (1967 a).

Jamieson, J.D., Palade, G.E.: Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. II. Transport to condensing vacuoles and zymogen granules. J. Cell Biol. 34, 597-615 (1967 b).

Karnovsky, M.J.: A formaldehyd-glutaraldehyd fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27, 137A (1965).

Karnovsky, M.J.: Use of ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy. Ann. Meeting Amer. Soc. Cell Biology, New Orleans, 284A (1971).

Keryer, G., Rossignol, B.: Effect of carbachol on $^{45}Ca$ uptake and protein secretion in rat lacrimal gland. Am. J. Physiol. 230, 1, 99-104 (1976).

Klebanoff, S.J., Lübke, R.G.: The antilactobacillus system of saliva. Role of salivary peroxidase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118, 483-486 (1965).

Kraehenbuhl, J.P., Racine, L., Jamieson, J.D.: Immunocytochemical localization of secretory proteins in bovine pancreatic exocrine cells. J. Cell Biol. 72, 406-423 (1977).

Leduc, E.H., Avreamas, S., Bouteille, M.: Ultrastructural localization of antibody in differentiating plasma cells. J. Exp. Med. 127, 105-118 (1968).

Leeson, R.C.: The electron microscopy of the myoepithelium in the rat exorbital lacrimal gland. Anat. Rec. 137, 45-56 (1960).

Leeson, R.C.: Myoepithelial cells in the exorbital lacrimal and parotid glands of the rat in frozen-etched replicas. Am. J. Anat. 132, 133-146 (1972).

Lettré, H., Paweletz, N.: Probleme der elektronenmikroskopischen Autoradiographie. Naturwissenschaften 11, 268-271 (1966).

Loewenthal, N.: Zur Kenntnis der Glandula infraorbitalis einiger Säugetiere. Anat. Anz. 10, 123-130 (1895).

Loewenthal, N.: A propos des glandes intraorbitaires. J. Anat. (Paris) 35, 130-132 (1899).

Loewenthal, N.: Drüsenstudien II. Die Glandula infraorbitalis und eine besondere, der Parotis anliegende Drüse bei der weißen Ratte. Arch. mikr. Anat. 56, 535-552 (1900).

Loewenthal, N.: Drüsenstudien IV. Beiträge zur Kenntnis der Entwicklung der Augenhöhlendrüsen. Arch. mikr. Anat. 79, 494-503 (1912).

Luciano, L.: Die Feinstruktur der Tränendrüse der Ratte und ihr Geschlechtsdimorphismus. Z. Zellforsch. 76, 1-20, (1967).

Luft, J.H.: Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 409-414 (1961).

Martinazzi, M.: La ghiandola lacrimale extraorbitale o ghiandola di Loewenthal: sua morfologia a controllo ormonale. Recenti Progr. Med. 34, 491-514 (1963).

Meldolesi, J., Jamieson, J.D., Palade, G.E.: Composition of cellular membranes in the pancreas of the guinea pig. I. Isolation of membrane fractions. J. Cell Biol. 49, 109-130 (1971 a).

Meldolesi, J., Jamieson, J.D., Palade, G.E.: Composition of cellular membranes in the pancreas of the guinea pig. II. Lipids. J. Cell Biol. 49, 130-149 (1971 b).

Meldolesi, J., Jamieson, J.D., Palade, G.E.: Composition of cellular membranes in the pancreas of the guinea pig. III. Enzymatic activities. J. Cell Biol. 49, 150-158 (1971 c).

Miller, F., Herzog, V.: Die Lokalisation von Peroxidase und saurer Phosphatase in eosinophilen Leukozyten während der Reifung. Elektronenmikroskopisch-cytochemische Untersuchungen am Knochenmark von Ratte und Kaninchen. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 97, 84-110 (1969).

Mizuhira, V., Futaesaku, Y.: On the new approach of tannic acid and digitonine to the biological fixative. Proc. Electron Microsc. Soc. Am. 29, 494-503 (1971).

Morrison, M., Allen, P.Z.: Lactoperoxidase: identification and isolation from Harderian and lacrimal glands. Science 152, 1626-1627 (1966).

Morrison, M., Steele, W.F.: Lactoperoxidase, the peroxidase in the salivary gland. In: "Biology of the Mouth", (American Association for the Advancement of Science, ed.). 89-110 (1968).

Novikoff, P.M., Novikoff, A.B., Quintana, N., Hauw, J.-J.: Golgi apparatus, GERL, and lysosomes of neurons in rat dorsal root ganglia, studied by thick section and thin section cytochemistry. J. Cell Biol. 50, 859-886 (1971).

Novikoff, A.B.: The endoplasmatic reticulum: A cytochemist's view (A review). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2781-2787 (1976).

Palade, G.E.: Intracellular aspects of the process of the protein synthesis. Science 189, 347-358 (1975).

Palade, G.E.: Intracisternal granules in the exocrine cells of the pancreas. J. Biochem. Biophys. Cytol. 2, 417-422 (1956 a).

Palade, G.E.: Pancreatic microsomes. J. Biochem. Biophys. Cytol. 2, 671-690 (1956 b).

Parod, R.J., Putney, J.W.,jun.: An alpha-adrenergic receptor mechanism controlling potassium permeability in the rat lacrimal gland acinar cell. J. Physiol. 281, 359-369 (1978).

Parod, R.J., Putney, J.W., jun.: The role of calcium in the receptor mediated control of potassium permeability in the rat lacrimal gland. J. Physiol. 281, 371-381 (1978).

Parod, R.J., Putney, J.W., jun.: Stimulus-permeability coupling in rat lacrimal gland. Am. J. Physiol. 239, G106-G113 (1980).

Parod, R.J., Leslie, B.A., Putney, J.W., jun.: Muscarinic and $\alpha$-adrenergic stimulation of Na and Ca uptake by dispersed lacrimal cells. Am. J. Physiol. 239, G99-G105 (1980).

Parod, R.J., Dambach, G.E., Putney, J.W., jun.: Membrane potential changes in lacrimal gland acinar cells elicited by carbachol and epinephrine. J. Pharmacol. Exper. Ther. 213, 473-479 (1980).

Pavelka, M., Ellinger, A.: Morphological and cytochemical indication for derivation of "GERL"-elements from the Golgi apparatus. Eur. J. Cell Biol. 27 (1), 23, abstract (1982).

Putney, J.W.J., jun., van de Walle, C.M., Leslie, B.A.: Stimulus-secretion coupling in the rat lacrimal gland. Amer. J. Physiol. 235 (5), C188-C198 (1978).

Rawitch, A.B., Taurog, A., Chernoff, S.B., Dorris, M.L.: Hog thyroid peroxidase: Physical, chemical, and catalytic properties of the highly purified enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 194, 244-256 (1979).

Redman, C.M., Siekevitz, P., Palade, G.E.: Synthesis and transfer of amylase in pigeon pancreatic microsomes. J. Biol. Chem. 241, 1150-1158 (1966).

Reynolds, E.S.: The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17, 208-212 (1963).

Richardson, K.C., Jarret, L., Finke, E.H.: Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. Stain Technol. 35, 313-323 (1960).

Rothman, S.S.: Protein transport by the pancreas. Science 190, 747-753 (1975).

Salpeter, M.M., Bachmann, L.: Autoradiography with the electron microscope. A procedure for improving resolution, sensitivity and contrast. J. Cell Biol. 22, 469-477 (1964).

Salpeter, M.M., Bachmann, L., Salpeter, E.E.: Resolution in electron microscope radioautography. J. Cell Biol. 41, 1-20 (1966).

Salpeter, M.M., Bachmann, L.: Electron microscope autoradiography. In: "Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications". (M.A. Hayat, ed.) R. v. Nostrand, New York, Vol. II, 221-278 (1972).

Salpeter, M.M., Mc Henry, F.A.: Electron microscope autoradiography. In: "Advanced techniques in biological electron microscopy". (J.K. Kochler, ed.) Springer-Verlag, Berlin, 113-152 (1973).

Salpeter, M.M., Farquhar, M.G.: High resolution analysis of the secretory pathway in mammotrophs of the rat anterior pituitary. J. Cell Biol. 91, 241-246 (1981).

Scott, B.L., Pease, D.C.: Electron microscopy of the salivary and lacrimal glands of the rat. Amer. J. Anat. 104, 115-161 (1959).

Scheele, G.A.: Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. J. Biol. Chem. 250, 5375-5385 (1975).

Scheele, G.A., Palade, G.E.: Studies on the guinea pig pancreas. 'Parallel discharge of exocrine enzyme activities.' J. Biol. Chem. 250, 2660-2670 (1975).

Schmidt, H.-W., Herzog, V., Miller, F.: Oxygen consumption of isolated acini from rat parotid gland. Eur. J. Cell Biol. 20, 201-208 (1980).

Schmidt, H.-W., Herzog, V., Miller, F.: Interaction of carbachol and isoproterenol on $O_2$ consumption and morphology of isolated acini from rat parotid gland. Eur. J. Cell Biol. 24, 85-87 (1981).

Seligman, A.M., Karnovsky, M.J., Wasserkrug, H.L., Hanker, J.S.: Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). J. Cell Biol. 38, 1-14 (1968).

Sharoni, Y., Eimerl, S., Schramm, M.: Secretion of old versus new exportable protein in rat parotid slices. J. Cell Biol. 71, 107-122 (1976).

Siekevitz, P., Palade, G.E.: A cytochemical study of the guinea pig. I. Isolation and enzymatic activities of cell fractions. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 203-218 (1958 a).

Siekevitz, P., Palade, G.E.: A cytochemical study of the guinea pig. II. Functional variations in the enzymatic activity of microsomes. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 309-318 (1958 b).

Siekevitz, P., Palade, G.E.: A cytochemical study of the guinea pig. III. In vivo incorporation of $^{14}C$-1-leucin into the proteins of cell fraction. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 557-566 (1958 c).

Siekevitz, P., Palade, G.E.: A cytochemical study of the guinea pig. IV. Chemical and metabolic investigation of the ribonucleoprotein particles. J. Biochem. Biophys. Cytol. 5, 1-10 (1959).

Siekevitz, P., Palade, G.E.: A cytochemical study of the guinea pig. V. In vivo incorporation of $^{14}$C-leucin into the chymotrypsinogen of various cell fractions. J. Biochem. Biophys. Cytol. 7, 619-630 (1960 a).

Siekevitz, P., Palade, G.E.: A cytochemical study of the guinea pig. VI. Release of enzymes and ribonucleic acid from ribonucleoprotein particles. J. Biochem. Biophys. Cytol. 7, 631-644 (1960 b).

Simionescu, N.,Simionescu, M.: Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy. I. Procedure, and evidence for mordanting effect. J. Cell Biol. 70, 608-621 (1976 a).

Simionescu, N., Simionescu, M.: Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy. II. The moiety and functional groups possibly involved in the mordanting effect. J. Cell Biol. 70, 622-633 (1976 b).

Sly, W.W., Stahl, P.: Receptor mediated uptake of lysosomal enzymes. In: "Transport of macromolecules in cellular systems." (S.C. Silverstein, ed.), Dahlem Konferenzen, Berlin, 229-244 (1978).

Tanaka, Y., Camilli, P.De, Meldolesi, J.: Membrane interactions between secretion granules and plasmalemma in three exocrine glands. J. Cell Biol. 84, 438-453 (1980).

Tilgner, S.: Die Anatomie des Auges der Ratte (Rattus norvegicus Berkenhout 1769) und seiner Adnexe. Habil.-Schrift, Math.-Nat. Fak. Univ. Halle, 788 S. (1967).

Venables, J.H., Coggeshall, R.: A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 25, 407-408 (1965).

Venkovsky, T.D.: Notes cytologiques sur la glande sous-parotidienne du rat albinos. Dimorphisme sexuel, vacuoles cytoplasmiques et vesicules intranucleaires. Z. Zellforsch. 55, 566-576 (1961).

Walker, R.: Age changes in the rats' exorbital lacrimal gland. Anat. Rec. 132, 49-70 (1958).

Williams, M.A.: Autoradiography and Immunocytochemistry. In: "Practical methods in electron microscopy." (A.M. Glauert, ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, Vol. VI, Part I, 1-217 (1977).

Wisse, E., Tates, A.D.: A gold latensification elon ascorbic acid developer for Ilford L4 emulsion. 4th Eur. Conf. on Elec. Micr., Rome, 465-466 (1968).

---

Abbildung 4 ist einer Arbeit von Herzog und Miller (1972) entnommen. Ich danke den Autoren für die Erlaubnis zur Wiedergabe.

# LEBENSLAUF

Angaben zur Person:

| | |
|---|---|
| Name: | Herbert Vogel, geboren am 14. Oktober 1944 in Bad Wiessee/Miesbach. |
| Eltern: | Walter Vogel, Verwaltungsangestellter<br>Hedwig Vogel, geb. Bauer |

Schulbildung:

| | |
|---|---|
| 1952-1956 | Volksschule Hohenfels/Parsberg und Tettnang |
| 1956-1960 | Progymnasium Tettnang |
| 1960-1963 | Evang. theol. Seminar Schönthal/Jagst und Urach |
| 1963-1965 | Spohngymnasium Ravensburg; Abitur |

Bundeswehr:

| | |
|---|---|
| 1965-1969 | Soldat auf Zeit; Leutnant |

Studium:

| | |
|---|---|
| 1969-1974 | Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München |
| 1974 | Diplomhauptprüfung in Biologie (Zoologie, Anthropologie, Genetik und Strahlenbiologie) |
| 1976 | (Juli) Abschluß der Diplomarbeit |
| 1976-1977 | Einarbeitung in immunologische, biochemische, cytochemische und elektronenmikroskopische Methoden am Institut für Zellbiologie der Universität München. |
| ab 1978 | Ausführung der vorliegenden Dissertationsarbeit unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. V. Herzog im Rahmen des DFG-Projektes He 796 "Exocytose". |